

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIDAD DE POSGRADO

**Aislamiento y caracterización bioquímica de
compuestos fenólicos con actividad anticoagulante del
extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea*
Aiton “chupasangre”**

TESIS

Para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Mirtha Marieta Yarlequé Chocas

Lima – Perú

2016

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Investigación de Bioquímica y Principios Activos Naturales de la Facultad de Medicina Hipólito Unanue de la Universidad Nacional Federico Villarreal y en Laboratorio del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

DEDICATORIAS

A la memoria de mis queridos padres Graciela y Félix, ¡Gracias..., por todo el amor y confianza que me brindaron!

A la memoria de mi sobrino Ronny Hernán, siempre te llevaré en mi corazón.

A mi esposo por sus sugerencias y compañía durante muchas horas en el laboratorio para la realización de la tesis.

A mis hijos: Luis Gabriel, Ecarina Mirtha y Dante Arturo, por hacerme una madre muy feliz y orgullosa.

A mis hermanos: Armando, Félix, Hernán y Luis, por el cariño y apoyo que siempre me brindaron.

A los jóvenes Yarlequé, por todo el esfuerzo que están haciendo para lograr sus metas, vamos sigan adelante, que sí van alcanzar todo lo que se proponen.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Pablo Bonilla Rivera miembro del Laboratorio del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por el asesoramiento en la ejecución de la presente tesis.

A los doctores Miguel Zaldívar y Carlos del Águila miembros del Laboratorio de Investigación de Bioquímica y Principios Activos Naturales de la Facultad de Medicina “Hipólito Unanue” de la UNFV, por todas las facilidades que me brindaron para la realización de la tesis.

A los miembros del Jurado Evaluador: Dr. Fred García Alayo y Dra. Fanny Lazo Manrique por sus correcciones oportunas con la finalidad de mejorar la presentación de la tesis.

A mi sobrina Milagros Yarlequé Pizango por la ayuda en la realización de trámites para la presentación de la tesis.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Medicina Hipólito Unanue de la UNFV, por el apoyo y solidaridad que siempre me brindaron.

ABREVIATURAS

Asp: Ácido aspártico

AEA: Actividad Específica Amidolítica

AE: Actividad Enzimática

ATIII: antitrombina III

BI: Banda I

BII: Banda II

BAPNA: Benzoil arginil p nitroanilida

CCF: Cromatografía de Capa Fina

F-2: Fracción 2

F-5: Fracción 5

Gli: Glicósido

His: Histidina

IC₅₀: Concentración Inhibitoria media

nm: Nanómetro

Qara: Quercetina O-3-arabinósido

Qn: Quercetina O-3-ramnósido

rpm : Revoluciones por minuto

Ser: Serina

μL y μg: Microlitro y microgramo

UV-Vis: Radiación del rango de luz Ultravioleta hasta Visible

UV-B: radiación UV- de tipo B.

U: Unidades de actividad

CONTENIDO

Pág

I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.ANTECEDENTES.....	3
III.HIPÓTESIS.....	10
IV.OBJETIVOS.....	10
V.MARCO TEÓRICO.....	11
5.1 Compuestos Fenólicos.....	11
5.2 Flavonoides.....	17
5.3Efectos de los flavonoides sobre la salud.....	23
5.4 Coagulación de la Sangre.....	27
5.5 <i>Oenothera rosea</i> “chupasangre”.....	40
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
6.1 Materiales.....	42
6.2 Métodos.....	44
VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
VIII. CONCLUSIONES.....	85
IX. RECOMENDACIONES.....	86
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
XI. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	99
XII. ANEXOS.....	101

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo aislar los principios activos fenólicos con actividad anticoagulante sobre el plasma humano y realizar su caracterización bioquímica *Oenothera rosea*, para lo cual se realizó: a) El extracto alcohólico y se detectó la presencia de fenoles, flavonoides, saponinas, glicósidos y taninos, b) a partir del extracto alcohólico se obtuvo la fase acuosa y se realizó una CCF sobre celulosa obteniéndose 9 fracciones, 5 de las cuales resultaron positivas para fenoles y flavonoides, y dos de éstas mostraron actividad anticoagulante sobre plasma humano citratado (PHC), fibrinógeno bovino (FB) y disminuyeron la actividad amidolítica (BApNA) que presentan la Trombina bovina (TB) y el veneno de *L.muta* (V). Los porcentajes de inhibición de la fase acuosa fueron 95,74 (TB-FB); 90,08 (V-FB); 63,58 (V-PHC) y 92,65 (V-BApNA). Para la fracción F-2: 58,57%, 10,67%, 34,14%, y 88,59 %; F-5: 96,79%, 36,27%, 70,69% y 92,92%, para cada uno de los sistemas, en el orden indicado para la primera muestra c) Por técnicas de espectrofotometría UV-Vis y reacciones de desplazamiento propuestos por Mabry et al.(1970) se han identificado los 5 flavonoides y se propone las siguientes estructuras: **F-2:** 3',4',5, trihidroxi-3,7-O-digli flavonol ; **F-3:** 3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-rhamno-glucosil flavonol (rutina), **F-4:** 3',4',5,7-tetrahidroxi-3-metóxido flavonol, **F-5 :** 3',4',-dihidroxi-7-O-gli-5 metóxido flavona y **F-6:** 5,6,7-trihidroxi flavona (Baicaleina). Los resultados indican que 3',4',5, trihidroxi-3,7-O-digli flavonol y 3',4',-dihidroxi, 7-O-gli, 5 metoxi flavona son los flavonoides glicosilados que inhiben la coagulación siendo F-5 el más potente. El mecanismo de acción no es conocido aún, pero ambos podrían con facilidad donar un H ácido del anillo B a la His 57 del centro activo de las enzimas y formar enlace de H con la Ser inhibiendo la actividad enzimática y formando un complejo flavonoide-enzima.

Palabras clave: anticoagulante, compuestos fenólicos, flavona, flavonol, trombina.

ABSTRACT

The study aimed to isolate the phenolic active ingredients with anticoagulant activity on human plasma and perform its biochemical characterization *Oenothera rosea*, for which it was made: a) the alcoholic extract and the presence of phenols, flavonoids, saponins, glycosides was detected and tannins, b) from the alcoholic extract the aqueous phase was obtained and TLC on cellulose obtained 9 fractions, five of which were positive for phenols and flavonoids, and two of them showed anticoagulant activity on human citrated plasma (PHC) was performed, bovine fibrinogen (FB) and amidolytic activity decreased (BApNA) having Thrombin bovine (TB) and poison L.muta (V). The inhibition percentages of the aqueous phase were 95.74 (TB-FB); 90.08 (V-FB); 63.58 (V-PHC) and 92.65 (V-BApNA). For the fraction F-2: 58.57%, 10.67%, 34.14% and 88.59%; F-5: 96.79%, 36.27%, 70.69% and 92.92% for each of the systems, in the order indicated for the first sample c) techniques UV-Vis spectrophotometry and reactions displacement proposed by Mabry et al (1970) have been identified and the following five flavonoid structures are proposed: F-2: 3', 4', 5, trihydroxy-3,7-O-digly flavonol; F-3: 3', 4', 5,7-tetrahydroxy-3-O-glucosyl-Rhamno flavonol (routine), F-4: 3', 4', 5,7-tetrahydroxy-3-methoxide flavonol, F-5: 3', 4' - dihydroxy-7-O-gly-5 flavone methoxide and F-6: 5,6,7-trihydroxy flavone (baicalein). The results indicate that 3', 4', 5, trihydroxy-3,7-O-digly flavonol and 3', 4' - dihydroxy, 7-O-gly, methoxy flavone 5 are glycosylated flavonoids inhibit clotting being F-5 the strongest. The mechanism of action is not known yet, but both could easily donate a H acid ring B to His 57 of the active site of the enzyme and form H-bond with Ser inhibiting enzyme activity and complexed flavonoid-enzyme.

Keywords: anticoagulant, phenolic compounds, flavone, flavonol, thrombin.

I. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos están presentes en numerosas especies de plantas, y son componentes importantes de la dieta humana. Así por ejemplo, el consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. Pero además, existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos tipos de cánceres y desordenes cardíacos, derivados de su poderosa actividad antioxidante.

La quercetina y la rutina son flavonoides ampliamente distribuido en el reino vegetal y son reconocidos por su acción antiinflamatoria, antioxidante y antiagregante de plaquetas. Se trata de compuestos polifenólicos presentes naturalmente en vegetales, frutas y plantas medicinales (*Ginkgo biloba*, *Tilia* sp., *Aesculus hippocastanum*, etc). La quercetina abunda en manzanas, cebollas, té y vino tinto, en donde aparecen como glucósido. Dependiendo de la dieta, el consumo de quercetina para la alimentación llega a superar los 500 mg diarios (Sánchez I, 2002).

En el 2002, Yarlequé et al., reportan que *Mutisia acuminata* presenta flavonoides glicosilados responsables del efecto anticoagulante sobre el plasma humano, posteriormente, el mismo grupo de investigación publica un artículo donde indica haber encontrado efecto anticoagulante en las hojas de *Oenothera rosea* “chupasangre” *in vitro*.

En los últimos años se han realizado algunas investigaciones sobre este tema, debido a la utilidad que puede tener contar con moléculas anticoagulantes para combatir problemas de salud humana como son las trombosis, que están relacionadas directamente con el corazón, el cerebro y extremidades ,por otra parte, al parecer estas moléculas inhiben directamente a la trombina o enzima semejante

a trombina, las cuales son serinoproteasas, grupo de enzimas donde se encuentran las de la coagulación y las enzimas digestivas las cuales en algunos casos deben ser inhibidas, por ejemplo en la pancreatitis aguda en la que se produce activación prematura de enzimas digestivas en el páncreas, lo que origina su auto-digestión.

Todas las serinoproteasas tienen un mecanismo de acción muy parecido donde participa la triada catalítica Ser, Asp e His. Maliar et al., 2003, reportaron que 5,7-dihidroxi flavonoide, quercetina, miricetina y morina inhiben a la tripsina y a la enzima semejante a trombina. Por otro lado, Bittencourt et al., 2015, señalaron que la quercetina y sus derivados glicosilados tienen la capacidad de interactuar a nivel del centro activo, pero la estructura de la quercetina es importante para la interacción inicial con trombina pero no es estable en comparación con las formas glicosiladas. Estos resultados son nuevos, debido a que algunos estudios habían informado que la quercetina y miricetina son los flavonoides de fuerte inhibición para la trombina. Estos investigadores, ensayaron la actividad enzimática con un sustrato cromogénico para trombina (beta-Ala-Gly-Arg-p-nitroanilida), que lo escinde proteolíticamente dando la beta-Ala-Gly-Arg y p-nitroanilina. Este método permite evaluar la actividad de la trombina porque el sustrato es específico para la enzima. Nosotros utilizamos un sustrato semejante BApNA, y los resultados inhibitorios también fueron muy marcados tanto para la F-2 como para F-5, por lo que, estos resultados indican que los dos flavonoides son inhibidores directos de la trombina y la enzima semejante a trombina del veneno de *Lachesis muta in vitro*, probablemente debido a un acoplamiento estérico que facilitan la donación de H⁺ a la His y se establezca un complejo enzima-flavonoide, unidos por enlace de hidrógeno y otras interacciones, que impide la actividad de la enzima.

II. ANTECEDENTES

Maliar et al., 2003, en su trabajo “Structural aspects of flavonoids as trypsin inhibitors” tuvo como objetivo buscar nuevos inhibidores de proteinasas en los compuestos polifenólicos utilizando la Detección y el Diseño Asistido por Ordenador de Drogas (CADD). Los resultados obtenidos indican que el 5,7-dihidroxi flavonoide es un inhibidor de la tripsina y de la enzima semejante a tripsina. Flavanonas y las isoflavonas son inhibidores de la tripsina en un nivel menor debido a una pérdida de la geometría óptima que conduce a interacciones con el hidrógeno del OH. Observaron cuatro modos de interacciones diferentes, los flavonoides (de tipo apigenina) se estabilizan en la región de S1 de β -tripsina por la formación de uno o dos enlaces de hidrógeno y además otras interacciones electrostáticas. La quercetina, la miricetina y la morina han demostrado ser los mejores inhibidores de la tripsina. En general, los flavonoides con grupos hidroxilo en la estructura del guanidinobenzoyl y de conformación plana son las estructuras capaces de tener efecto inhibidor de tripsina. Por lo que, esta clase de flavonoides se pueden sintetizar por métodos de biotecnología como medicamentos para pacientes con pancreatitis, con tumores cancerígenos y con procesos inflamatorios.

Mozzicafredo et al., 2006, publicaron “Flavonids inhibit the amidolytic activity of human thrombin”, donde evaluaron el efecto de un grupo de flavonoides naturales sobre la actividad amidolítica de la trombina humana”, encontrando que todos los flavonoides ensayados actuaron como inhibidores reversibles, y que el complejo de quercetina -trombina era más estable a pH 7,5.

Jedinák et al., 2006, reportaron “Inhibition Activities of Natural Products on Serine Proteases” en el que evaluaron doce compuestos fenólicos naturales y un alcaloide sobre la inhibición de serinoproteasas. El flavonoide Silibina (extraído de *Silybum marianum*) mostró un efecto altamente selectivo con un valor de $IC_{50} = 11.4$ ug para la trombina, lo que sugiere que pueda ser una estructura adecuada para el desarrollo de inhibidores de la trombina y por lo tanto para fármacos trombolíticos.

También encontraron inhibición de hiperósido (quercetina -O-3-galactósido) ($IC_{50} = 8,3 \text{ ug}$) sobre la uroquinasa y concluyeron que los flavonoides son estructura adecuada para la investigación de inhibidores de uroquinasa como fármacos potenciales para la terapia del cáncer, además se encontró una muy alta actividad inhibidora de la tripsina por el flavonoide silibina ($IC_{50} = 3,7 \text{ ug}$), lo que indica a los polifenoles como posibles inhibidores de las serinoproteasas.

Torres et al., 2008, realizaron el trabajo “Efecto Antitrombótico: Una característica poco conocida de las frutas y hortalizas”, con el objetivo de evaluar los efectos antitrombóticos: antiagregante plaquetario, anticoagulante y fibrinolítico en frutas y verduras. Los resultados que obtuvieron fueron: En cuanto al efecto antiagregante plaquetario, entre las frutas que poseen dicha característica se incluyen uva negra, piña, frutilla y kiwi. Entre las hortalizas con efecto antiagregante están el ajo, la cebolla, el cebollín, el tomate y el melón. Por otra parte, el efecto anticoagulante, entre las frutas, sólo se encontró en la piña, y entre las hortalizas en ajos y cebollas. El efecto fibrinolítico se ha descrito en frutas como el kiwi, la piña y hortalizas como el ajo, las cebollas y la soya.

Cuccioloni et al., 2009, en su artículo “Pomegranate fruit components modulate human thrombin”, realizaron la evaluación del efecto inhibitorio de la actividad amidolítica por efecto de los polifenoles de la granada sobre la trombina humana, llegando a la conclusión que estos polifenoles presentan acción inhibitoria sobre enzimas proteolíticas como la trombina.

Liu et al., 2010, en su trabajo “A Series of Natural Flavonoids as Thrombin Inhibitors: Structure-activity relationships”, han evaluado flavonoides como posibles inhibidores de la trombina utilizando el método optimizado de tiempo de trombina. Encontrando que miricetina y quercetina son los mejores inhibidores de la trombina. Con el fin de investigar el reconocimiento de trombina de los compuestos más activos y selectivos, un estudio de modelado molecular se ha realizado utilizando estructuras disponibles Protein Data Bank (PDB) como modelo de receptor para

experimentos de acoplamiento ya que la relación estructura-actividad de los flavonoides (SAR) sobre trombina facilitarían el diseño de compuestos químicos con mayor potencia para servir como potenciales inhibidores de la trombina, y proporcionar información para la utilización de los flavonoides como inhibidores de la trombina en el tratamiento de las enfermedades trombóticas.

Concha B. (2010), en su artículo “Efecto *in vitro* del látex de *Ficus insípida* sobre la cascada de la coagulación sanguínea”. El objetivo fue comprobar el efecto anticoagulante *in vitro* y determinar la vía de la coagulación sobre la que actúa el látex de *Ficus insípida*. Los resultados fueron: el látex de *Ficus insípida* prolongó el tiempo de protrombina (TP) a una concentración mayor o igual a 0,03125% (V/V), y ambos, el TP y el tiempo de protrombina parcial activada (TTPa) a una concentración mayor o igual a 0,15% (V/V). La conclusión a la que llegó fue: El látex de *Ficus insípida* posee un efecto anticoagulante *in vitro* dosis dependiente sobre la vía extrínseca de la coagulación sanguínea a una concentración igual o mayor a 0,031% y que a una concentración igual o mayor a 0,15% posee un potente efecto anticoagulante sobre ambas vías de la coagulación.

Bijak et al., 2011, publicaron “Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds”, realizaron la evaluación del efecto anticoagulante de los extractos de bayas de *Aronia melanocarpa* o semillas de *Vitis vinifera* (0,5; 5; 50 mg/ml) en plasma fresco con trombina. Ellos encontraron que ambos extractos prolongan el tiempo de coagulación y disminuyen la velocidad de polimerización de fibrina en el plasma humano, y además inhiben la actividad amidolítica.

Viskupicova et al., 2012, publicaron el artículo “Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: a quantum-chemical QSAR analysis” donde investigaron la posibilidad de que ésteres de ácidos grasos de polifenoles puedan inhibir la actividad de serina proteasas de tipo tripsina, trombina, elastasa y uroquinasa. Hallando que los derivados de rutina como la rutina esterificada con ácidos grasos

poliinsaturados de cadena media y larga mostraron potente efecto inhibidor de las proteasas a concentraciones de micromolares (uM).

Pawlaczyk et al., 2013, en su trabajo Effects of extraction condition on structural features and anticoagulant activity of *Fragaria vesca*, “fresa salvaje”, encontraron que una fracción de altas concentraciones de polifenoles mostraron inhibición completa para la formación de coágulos de plasma humano *in vitro*.

Khoo et al., 2014, reportaron el trabajo “Anticoagulant Activity of Polyphenolic-Polysaccharides Isolated from *Melastoma malabathricum* L”, evaluaron el extracto crudo obtenido por infusión de las hojas de *M. malabathricum* encontrando actividad anticoagulante, por lo que realizaron la purificación y determinaron los compuestos químicos bioactivos sobre la reacción de coagulación de la sangre. Llegando a la conclusión que la presencia de altas concentraciones de ácidos hexurónicos y polisacáridos, así como los polifenoles de las plantas medicinales juegan un papel importante en la prolongación del tiempo de coagulación de la sangre en la vía intrínseca.

Bijak et al., 2014, publicaron “Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X”, cuyo objetivo fue examinar los efectos de los compuestos polifenólicos de plantas que mostraron alterar la actividad amidolítica del factor Xa y caracterizar sus interacciones, utilizando el método de acoplamiento bioinformático. Los resultados fueron que sólo cuatro polifenoles que pertenecen al grupo de los flavonoides: procianidina B2, cianidina, quercetina y el silibina, tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad del Factor Xa. Los análisis bioinformáticos revelaron que procianidina B2, cianidina, quercetina y silibina, situados en las proximidades del sitio activo del FXa bloquean el acceso del sustrato a nivel de la Ser195.

Bittencourt et al., 2015, realizaron “Evaluation of Potential Thrombin Inhibitors from the White Mangrove (*Laguncularia racemosa*)”. El objetivo del trabajo fue

verificar los efectos de los extractos metanólicos y extractos hidroalcohólicos (HA) y sus respectivas fases de partición obtenidos del fraccionamiento del mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) sobre la actividad de la trombina humana. Los resultados indican que sólo los extractos obtenidos por cromatografía de partición con acetato de etilo y butanol inhibieron significativamente la actividad de la trombina humana y la coagulación de plasma en presencia de esta enzima. La fase butanólica del extracto MeOH tenía los efectos inhibidores más potentes, reduciendo de la actividad sobre sustrato sintético y alargando el tiempo de la coagulación de plasma por inhibición de la trombina. Dos flavonoides glicosilados se identificaron como los más potentes inhibidores de la actividad de la trombina humana, la quercetina-3-O-arabinósido (Qara) y quercetina-3-O-ramnósido (Qn). El análisis cromatográfico del extracto metanólico incubado con trombina y de los flavonoides aislados también evaluados con la enzima mostraron cambios estructurales producidos en la trombina, lo que sugiere que estos metabolitos inducen cambios químicos en la estructura proteica lo cual afecta su actividad coagulante.

Yarlequé M. et al. (2002) aislaron e identificaron, flavonoides provenientes de una extracción alcohólica de la planta *Mutisia acuminata*, responsables de retardar el tiempo de recalcificación del plasma humano citratado. Realizaron mediante una cromatografía rápida en sílica gel del extracto alcohólico, con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, metanol y agua. A la fase acuosa se le realizó una cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios de celulosa y un sistema de solventes: butanol, ácido acético y agua (BAW; 4: 1: 5, fase orgánica). Se realizó la lectura en el espectrofotómetro Génesis II, de los compuestos aislados, en un rango $\lambda = 200-500$ nm y, posteriormente, fueron comparados con los espectros UV reportados por Mabry (1970). El tiempo de recalcificación se evaluó sobre plasma humano citratado y los resultados indicaron que la fase acuosa de la cromatografía rápida presentó efecto anticoagulante y mediante la cromatografía en capa fina en silicagel se aisló 2 flavonoides responsables del efecto: la 3', 4', 5,-trihidroxi- 7-O-gli flavanona y 3', 5-dihidroxi-4-O-metil-7-O-Rh-glucosil flavanona.

Yarlequé M. et al., 2007, realizaron el trabajo de investigación sobre “El Efecto anticoagulante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *O. rosea Aiton* (chupasangre), cuyo objetivo fue: Determinar el efecto anticoagulante *in vitro* del extracto acuoso de las hojas de *O. rosea* sobre plasma humano citratado. Ellos señalaron, haber determinado el efecto sobre el plasma humano citratado encontrando que a concentraciones 0,25 mg/mL hasta 1000 mg /mL, se prolonga el tiempo de coagulación obteniéndose tiempos de $900 \pm 1,44$ s hasta más de una hora, para las concentraciones indicadas. La marcha fitoquímica determinó la presencia de grupos fenólicos, flavonoides y taninos. Con la cromatografía en capa fina sobre celulosa, se detectó 7 bandas reveladas con Fe Cl_3 lo que indicaban su naturaleza fenólica. Finalmente, los espectros UV-Vis obtenidos con etanol mostraban espectros de absorción característicos de los compuestos fenólicos. La conclusión a que llegaron fue que el extracto acuoso de las hojas de *O. rosea Aiton* presentó efecto anticoagulante sobre plasma humano citratado desde la concentración de 0,250 mg/ml y que los metabolitos responsables son de naturaleza fenólica.

Díaz et al., 2011, publicaron “Efecto antiagregante plaquetario *in vivo* y fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea Aiton* (chupasangre)”, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del extracto etanólico de las hojas de *O. rosea* sobre la hemostasia. Los resultados hallados en el análisis fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *O. rosea*, se identificaron: taninos, flavonoides, quinonas, alcaloides y saponinas, dentro de las cuales los flavonoides son al parecer los que tienen actividad fibrinolítica *in vitro*. Para determinar su actividad sobre la hemostasia se evaluó el efecto fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico a las siguientes concentraciones: 5,8; 0,29 y 0,014 mg/ml en sangre venosa humana; para el efecto antiagregante plaquetario se administró 25, 50 y 100 mg/Kg del extracto a 40 ratas albinas hembras. Al grupo control se administró suero fisiológico 5 ml/Kg y se utilizó aspirina 100 mg/Kg, como fármaco estándar; se determinó el tiempo de protrombina y tiempo de coagulación. Las conclusiones a que llegaron fueron que presentó efecto antiagregante plaquetario *in*

vivo y efecto fibrinolítico *in vitro* al lizar los coágulos con la concentración de 5,8 mg/ml.

Rojas et al., 2013, realizaron el trabajo “Actividad Antioxidante, Anti-Elastasa, Anti-Colagenasa, Protectora contra rayos UV-B, Promotora de Síntesis de Colágeno *in vitro* y Estudios de Seguridad/Eficacia de extractos de *Bixa orellana* (“Achiote”) y *Oenothera rosea* (chupasangre)”. Las conclusiones a que llegaron fueron: que Los extractos de Achiote y Chupasangre poseen buena actividad antioxidante *in vitro*, inhiben moderadamente la enzima elastasa y altamente la enzima colagenasa, ambas serinoproteasas. El extracto de Achiote promueve la síntesis de colágeno, mientras que el de Chupasangre tiene actividad protectora contra la radiación UV- de tipo B (UV-B).

III. HIPÓTESIS

Si el extracto alcohólico *O. rosea* causa inhibición de la coagulación del plasma humano citratado entonces, en el contenido de dicho extracto existen componentes fenólicos responsables de este efecto a nivel de la conversión de fibrinógeno en fibrina.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar los componentes fenólicos con actividad anticoagulante sobre el plasma humano y realizar su caracterización bioquímica, de la planta medicinal *O.rosea*.

Objetivos Específicos

- a) Preparar el extracto alcohólico a partir de plantas exprofesamente colectadas para este estudio.
- b) Determinar mediante ensayos el grado de incoagulabilidad que ejercen los extractos sobre plasma humano citratado *in vitro*.
- c) Identificar y cuantificar los principales grupos fenólicos asociados con el efecto anticoagulante.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en los vegetales. Se encuentran en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles presentes en las plantas están asociados al color, al sabor, a las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los polifenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Robbins et al., 2003; Kähkönen et al., 2001).

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shiquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química (donador de H^+) necesarios para el funcionamiento de las células vegetales; se encuentran en frutas y verduras, por ejemplo, manzanas y cebollas, y en bebidas como té y vino (Leighton et al., 2001).

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los

ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Bravo L., 1998). En algunas plantas, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los poliacetatos es similar a la de los ácidos grasos; sobre una molécula cebador, que en la mayoría de los casos es el acetil CoA se van adicionando sucesivamente unidades de malonil CoA, con pérdida de un átomo de carbono (CO_2), de modo que de cada malonil que participa se integran dos átomos de carbono (Wagner et al., 1975). Las enzimas que participan se hallan asociadas, formando un complejo multienzimático que catalizan todos los pasos de la biosíntesis, y los compuestos que abandonan el complejo son los ácidos policétidos íntegramente formados. La acetil CoA activa el complejo enzimático y sobre el complejo se va uniendo las moléculas de malonil CoA. Un compuesto formado siguiendo esta ruta es el ácido 6-metilsalicílico, un tetracétido. En estas estructuras, se alternan átomos con y sin oxígeno, muy inestables, y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico (Wagner et al., 1975, Hellner et al., 1986), Figura1.

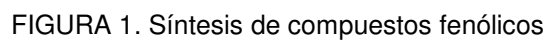
La ruta del Ácido shikímico, es dependiente de luz, se inicia en los cloroplastos por condensación de dos moléculas fotosintéticas, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y después una secuencia de reacciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en las plantas. (Hellner et al., 1986). Normalmente la ruta del ácido shikímico sigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en el ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es transformado en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en *p*-cumaroil CoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los polifenoles del vino, té, etc. (Wagner et al., 1975), Figura1.

El ácido shikímico se aisló inicialmente en 1885 de la planta asiática "shikimi-no-ki" *Illicium sp.* (Fam. Illiciaceae) y es reconocido como el compuesto punto de partida para un gran número de sustancias naturales

La acción del PAL (fenilalanina amonio liasa) es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente modulada. Entre otros factores, esta enzima es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. En general, la actividad PAL aumenta cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones UV. Otro factor que activa la enzima PAL es el frío, plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas. También se sabe, que al florecer las plantas en primaveras después de inviernos muy fríos, las flores presentan colores muy intensos (Hellner et al., 1986; Wagner et al., 1975).

La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides, (Manach et al., 2004), Figura 2.

Las principales clases de polifenoles por ser los más ampliamente distribuidos en los alimentos son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos (Manach et al., 2004), Figura1.



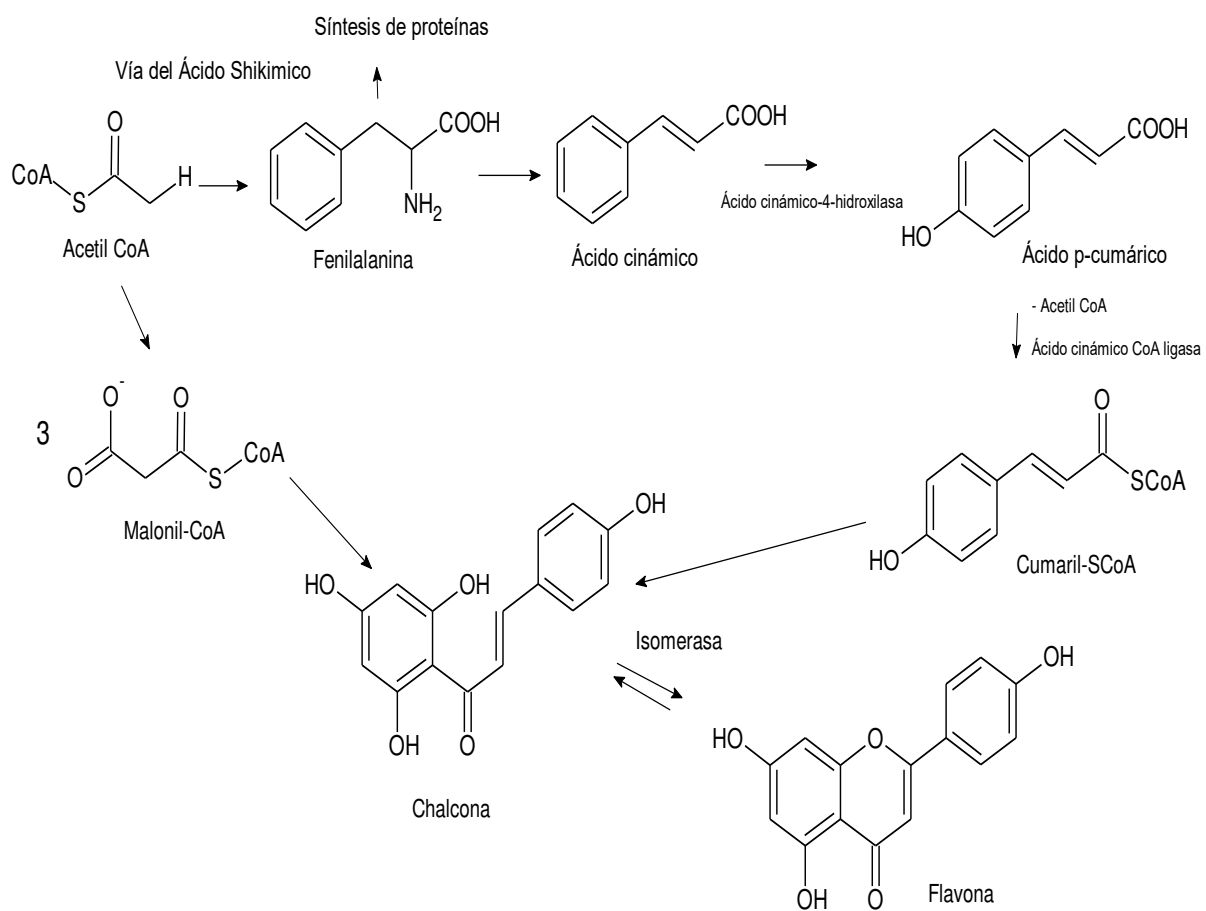
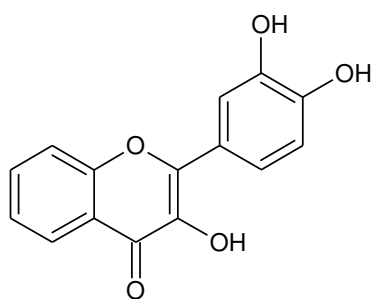
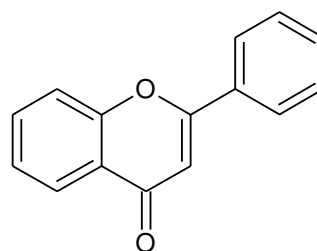


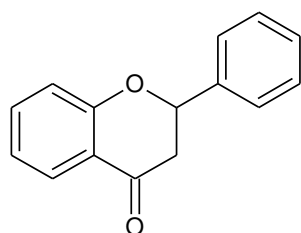
FIGURA 2. Vía de síntesis de los flavonoides



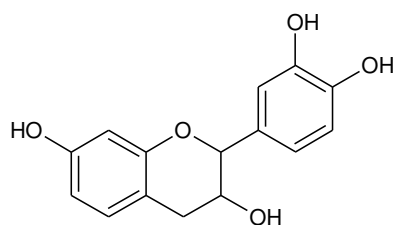
Flavonol



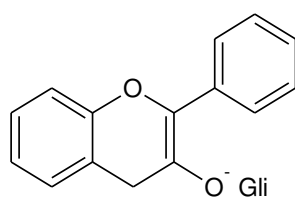
Flavona



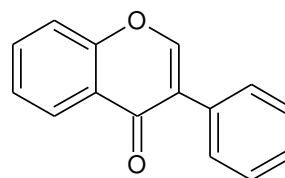
Flavanona



Flavanol



Antocianina



Isoflavona

FIGURA 3. Estructura química de los flavonoides más comunes.

TABLA 1. Algunas clases de flavonoides y sus sustituyentes

FLAVONOIDES		SUSTITUYENTES									
Clases	Flavonoides	2	3	4	5	6	7	3'	4'	5'	6'
FLAVAN-3 -OL	Catequina	---	OH	---	OH	---	OH	OH	OH	H	---
ANTOCIANIDINA	Cianidina	---	OH	---	OH	---	OH	OH	OH	H	---
	Pelargonida	---	OH	---	OH	---	OH	OH	H	H	---
FLAVONAS	Apigenina	---	H	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Diosmina	---	H	---	OH	---	OR ₁	OH	OMe	H	---
	Luteolina	---	H	---	OH	---	OH	OH	OH	H	---
FLAVANONAS	Naringenina	---	H	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Naringina	---	H	---	OH	---	OR ₁	H	OH	H	---
	Hesperetina	---	H	---	OH	---	OH	OH	OMe	H	---
	Hesperidina	---	H	---	OH	---	OR ₁	OH	OMe	H	---
CHALCONAS	Floretina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	H	OH	OH
	Floridzina	OR ₂	OR ₂	H	H	OH	OH	H	H	OH	OH
FLAVON-3-OLES	Quercetina	---	OH	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Kaempferol	---	OH	---	OH	---	OH	H	OH	H	---
	Miricetina	---	OH	---	OH	---	OH	OH	OH	OH	---
	Fisetina	---	OH	---	H	---	OH	OH	OH	H	---
	Morina	---	OH	---	OH	---	OH	H	OH	H	---

R₁: Rutinosa. R₂: Glucosa

5.2 Flavonoides

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal.

El primer flavonoide fue identificado en 1930, por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Albert Szent-Györgyi, quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, capaz de regular la permeabilidad de los capilares al ser consumida. Los flavonoides se consideraron inicialmente vitaminas, denominados vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2, porque algunos tenían propiedades similares a la vitamina C.

Los flavonoides son un grupo heterogéneo de polifenoles, de bajo peso molecular y que se caracterizan por presentar 3 anillos, 2 de benceno denominados A y B, unidos por un tercer anillo C heterocíclico oxigenado (C6-C3-C6), presentan oxhidrilos (OH) en el anillo A y C, (Figura 3) y se clasifican en seis grupos de acuerdo al estado de oxidación que presenta el anillo C : flavonoles, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianinas e isoflavonas (Mabry et al.,1970; Lock, 1994; Martínez et al.,2004), Figura 2 y Tabla 1.

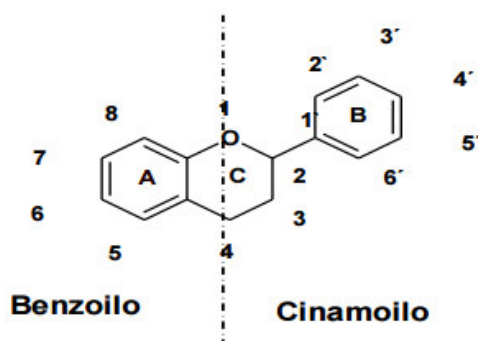


FIGURA 4: Estructura química general de los flavonoides

En las plantas, algunos flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. Desde el siglo pasado es bien conocida la relación que existe entre la presencia de flavonoides en las plantas y su resistencia a las infecciones fúngicas y virales. Otra de sus importantes funciones en muchas plantas es la atracción de los insectos polinizadores por medio del color o del olor que les confieren a éstas o a sus flores asegurando así su reproducción y conservación (Estrada et al., 2014).

Actualmente se conoce que los flavonoides presentes en los vegetales protegen al organismo humano de los rayos UV y de la contaminación de agentes oxidantes. Estos contienen excelentes propiedades de quelación de hierro, cobre y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Deben obtenerse a través de la alimentación o suplementos ya que el humano no es capaz de producirlos (Martinez-Flores et al. ,2004).

Los flavonoides que tienen mayor interés biológico y están presentes en los alimentos son las flavonas, flavonoles, isoflavonas, Flavanonas y sus correspondientes heterósidos, así como las antocianinas, Figura 3. En su relación con el hombre, se utilizan para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desordenes cardiovasculares debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Algunos flavonoides pueden presentar actividad hepatoprotectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas, como la ocasionada a las oxidasas y otras enzimas. Sin embargo, estos compuestos pueden actuar como agentes prooxidantes, rasgo probablemente responsable de los efectos mutagénicos y genotóxicos también encontrados para algunos de estos metabolitos en diversos sistemas experimentales. Algunos de los mecanismo a través de los cuales ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), así como su acción negativa contra las funciones de los

componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear glutatión y glutatión-S transferasa (Pérez G., 2003).

La mayor parte de los flavonoides (a excepción de las catequinas) están presente en las plantas y alimentos en forma de β -glicósidos. La más frecuente de las unidades de glicosidación es la glucosa pero además la glucoramnosa, la galactosa, la arabinosa y la ramnosa. Una vez que son ingeridos y antes de entrar a la circulación general, estos glicósidos pueden sufrir hidrólisis de la siguiente forma: debido a que la unión β de estos azúcares resiste la hidrólisis de las enzimas pancreáticas, este proceso se lleva a cabo predominantemente en el lumen intestinal por la acción de dos enzimas: 1.) la lactasa phloridzina hidrolasa (LPH), que se encuentra en la membrana de los enterocitos ,cuando los flavonoides son hidrolizados por esta enzima atraviesan por difusión pasiva la membrana intestinal y 2.) la enzima β -glucosidasa citosólica no específica (CBG), que es capaz de hidrolizar una amplia variedad de glicósidos incluyendo glucósidos, galactósidos, xilósidos, arabinósidos y fructósidos.(Németh K,2003; Day AJ,2000; Berrin JG,2002).Esta enzima está localizada intracelularmente en los enterocitos, por lo que se requiere del transporte activo de los glicósidos por medio del cotransporte sodio-glucosa (SGLT-1) como lo señala Estrada et al.,(2014) .

Por otra parte, los glicósidos que no son hidrolizados por LPH o no son transportados por SGLT-1 se dirigen hacia el colon donde son hidrolizados por las bacterias presentes en ese medio.Los flavonoides una vez hidrolizados (agliconas) se conjugan por metilación, sulfatación o glucuronidación principalmente y debido a que tienen una capacidad de conjugación alta su concentración en el plasma es por lo general baja. Estudios realizados con ratas mostraron la presencia de metabolitos conjugados en la sangre portal, lo cual apoya que la conjugación se inicia en los enterocitos antes de pasar al hígado (Hollman P., 2004).

Clasificación de los Flavonoides

Flavonoles

Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3. Representan el grupo más abundante de polifenoles presente en los alimentos. La quercetina es el más representativo. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas. El té y el vino son también alimentos ricos en flavonoles. La biosíntesis de flavonoles es un proceso fotosintético. Por ello, estos compuestos se localizan principalmente en el tejido externo y aéreo de la planta. La distribución y la concentración de los flavonoles puede ser distinta incluso en frutas procedentes de la misma planta; esto se debe a que la localización de los frutos condiciona la exposición al sol (Heim et al., 2002).

Flavonas

Poseen un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos. Perejil y apio representan la única fuente comestible de flavonas. La piel de las frutas también posee grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas (Heim et al., 2002).

Flavanonas

Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C7. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos. Las flavanonas aparecen a altas concentraciones en cítricos y en ciertas plantas aromáticas como la menta. Las flavanonas se localizan mayoritariamente en las partes sólidas de la fruta. Por ello, su concentración es hasta cinco veces mayor en la fruta que en los zumos, (Heim et al., 2002).

Isoflavonas

Poseen un anillo bencénico lateral en posición C3, su estructura recuerda a la de los estrógenos. Las isoflavonas poseen grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C4', al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona). En realidad, las isoflavonas se pueden unir a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se pueden presentar como agliconas, o a menudo conjugadas con glucosa, pero son termosensibles y pueden hidrolizarse durante su procesamiento industrial y durante su conservación. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas (Heim et al., 2002).

Antocianidinas

Son compuestos hidrosolubles, y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glicosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C ó en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Las antocianidinas están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas (Heim et al., 2002).

Flavanoles

Poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C3. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. A diferencia de otros grupos de flavonoides, sus combinaciones de tipo heterosídico (entre el grupo reductor del azúcar y un grupo tiol) son poco habituales. Los flavanoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Epicatequina y catequina son los

compuestos mayoritarios en frutas. Las catequinas también se encuentran en el vino y en el chocolate, que son las fuentes mayoritarias, (Heim et al., 2002; Quiñones et al., 2012), Figura 3.

5.3 Efectos de los Flavonoides sobre la salud humana

Los flavonoides parecen jugar un papel importante en la salud humana y de poseer efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades. Una propiedad fundamental de estas moléculas, responsables de muchos de sus efectos beneficiosos, es la capacidad antioxidante, vinculado a la presencia de una serie de características estructurales que les permiten, entre otros, quelar iones de metales de transición tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} . Participa durante la catálisis en el transporte de electrones inhibiendo las especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido, oxígeno singlete y radicales lipídicos, o para estabilizar ROS libres por medio de la hidrogenación o la formación de complejos con las especies oxidantes. La capacidad antioxidante de los flavonoides confiere un potencial terapéutico en enfermedades entre las que se incluyen las enfermedades cardiovasculares, úlceras gástricas o duodenales, cáncer o patologías hepáticas (Martínez et al., 2004; Yang et al., 2000; Péres et al., 2000), también son importantes sus acciones antivirales y antialérgicas, así como su efecto antitrombótico y propiedades antiinflamatorias (Nijveldt et al., 2004). Este último constituye un aspecto usado durante mucho tiempo en la medicina tradicional china y la industria cosmética bajo la forma de extractos de plantas, pero últimamente, se ha comenzado a explorar en profundidad, con el fin de identificar los mecanismos responsable y la posibilidad de uso de flavonoides como agentes anti-inflamatorios (Moreira et al., 2004).

Efecto antioxidante

Un antioxidante, es un compuesto químico que inhibe o disminuye la oxidación de otras especies químicas, cuando está en cantidades pequeñas protegiendo a las células de los radicales libres que se forman durante el metabolismo celular.

Últimamente, se habla mucho de los flavonoides como moléculas con capacidad antioxidante debido a la presencia de grupos hidroxilos en la estructura, los que serían los responsables de tal efecto, por tanto, impedirían la oxidación de los lípidos presentes en la membranas celulares por medio de la neutralización del oxígeno reactivo de radicales hidroxilo, de los peróxidos lipídicos y de los aniones superóxido (Luis et al., 2008). El efecto antioxidante se ha explicado por la presencia del grupo O-dihidroxi en el anillo B, el cual le da mayor estabilidad, y de esta forma permite captar el electrón del radical libre. Igualmente, el doble enlace en la unión con la función 4-oxo del anillo, es capaz de captar dichos electrones y los grupos 3-OH y 5-OH, con la función 4-oxo de los anillos A y C que tienen la mayor capacidad antioxidante (Russo et al., 2006).

Se ha reportado, que estos compuestos pueden inhibir enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) como la lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, la xantina oxidasa y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Orallo et al. 2002; Raza et al. 2005), enzimas relacionadas con procesos oxidativos y al mismo tiempo por estimular enzimas que participan en eventos antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, las cuales forman parte de los sistemas endógenos, captadores de radicales libres (Pérez et al., 2002)

Los polifenoles del té muestran una fuerte capacidad antioxidante in vitro, y su efecto es hasta 5 veces más efectivo que el de la vitamina C o la vitamina E (Dreosti, 1996; Raza et al. 2005;). Por otra parte, se ha observado que el flavonoide epigallocatequina galato, procedente del té, puede regular la producción de ROS, modulando la actividad del glutatión y de la enzima citocromo P450 (Leifert et al., 2008). El vino también es rico en polifenoles antioxidantes, principalmente ácidos fenólicos, resveratrol, flavonoles, flavanoles, procianidinas y antocianinas. El cacao es uno de los alimentos que contiene mayor cantidad de flavonoides, principalmente epicatequina y catequina. Actualmente hay gran interés en estudiar el cacao y sus derivados por los beneficios a la salud humana (Lee et al., 2003; Pérez et al., 2002).

Una generación excesiva de ROS puede contribuir a la iniciación tumoral. En esta etapa temprana del desarrollo del cáncer, los polifenoles, gracias a su actividad

antioxidante, pueden prevenir del daño oxidativo al DNA causado por los radicales libres e impedir el proceso de iniciación de la carcinogénesis. Dicho bloqueo puede tener lugar a través de diferentes mecanismos: 1) captación directa de los radicales libres, 2) quelación de los cationes divalentes implicados en reacciones de Fenton y 3) modulación de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (Surh, 2003; Ramos, 2008).

Efecto antitrombótico

El efecto antitrombótico de los polifenoles se asume en base a la capacidad que tienen para inhibir enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides, como el tromboxano A₂ (TXA₂), la ciclooxigenasa (COX), y la lipooxigenasa (LPO) a partir del ácido araquidónico procedente de las membranas celulares. Por tanto, la agregación plaquetaria también juega un papel fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis, y el efecto antiagregante puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular. En el estudio realizado por Torres et al. (2008), encontraron que ciertas frutas (uvas negras, kiwi, piña y frutilla) y verduras (ajos, cebollas, tomates, melón y soja) consumidas en la dieta normal mostraban efectos antiagregantes plaquetarios, anticoagulante y fibrinolítico *in vitro*. Lo que podría estar relacionado con los polifenoles presentes en estos alimentos. Ya desde los trabajos de Yomamoto et al., (1984) y Laughton et al., (1991) indicaron el efecto de las benzoquinonas y algunos flavonoides sobre la vía sintética de los leucotrienos vasoactivos, encontrando que la 3'-4'-5 tri-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona es un potente inhibidor de la Lipooxigenasa (LO) gracias a sus propiedades quelantes y reductoras de hierro.

Algunos flavonoides inhiben por lo tanto la síntesis de moléculas derivadas del ácido araquidónico que están directamente involucradas en la regulación de la homeostasis vascular. También se ha demostrado, que las procianidinas del cacao estimulan la formación de prostaciclina (PGI₂), un inhibidor de la agregación plaquetaria e inhiben la formación de los leucotrienos agentes vasoconstrictores y estimulantes de la inflamación (De Gaetano et al., 2002). Es por eso, que se llega a

la hipótesis de que los polifenoles del cacao, inhiben la coagulación y favorecen la fluidez sanguínea, evitando la formación de trombos. Por tanto, disminuyen el riesgo a sufrir un accidente vascular, al parecer actúan en cierto modo a través de mecanismos diferentes a los de la aspirina, y sus efectos junto con el fármaco serían complementarios, lo señalan Murphy et al., (2003).

Yamada et al. (2004) reportaron que una variedad de cebolla, *Toyohira*, mostró actividad antitrombótica significativa tanto *in vitro* como *in vivo* y el efecto antiplaquetario. Las variedades *Superkitamomiji*, 2935A, y K83211, sólo mostró actividad trombolítica, al evaluar la quercetina presente en esta variedad de cebolla, no se encontró la mencionada actividad, por lo que infieren que este flavonoide no sería el responsable del efecto sobre los trombocitos.

Efecto Antiinflamatorio

Diversos reportes indican que los flavonoides están relacionados con la actividad antiinflamatoria ya que se han encontrado que son capaces de inhibir una serie de enzimas que se activan durante los procesos inflamatorios; las prostaglandinas y óxido nítrico (Kwon et al., 2005). La biosíntesis de moléculas que están implicada en la inflamación e isoformas inducibles de óxido nítrico sintasa (iNOS) y de la ciclooxigenasa (COX-2) son responsables de la producción de una gran cantidad de estos mediadores inflamatorios. Estudios *in vitro* han confirmado que la quercetina inhibe la producción de óxido nítrico y la expresión de iNOS (Martínez-Flores et al., 2005). Existen diferencias entre los efectos de los flavonoides aun siendo parecidos, ejemplo, la quercetina y el kaempferol muestran pequeñas diferencias en su capacidad de inhibición de la expresión de iNOS en cultivos celulares lo que podría contribuir al efecto antiinflamatorio de los flavonoides. Así, en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón las iNOS son inhibidas por quercetina a nivel traduccional, disminuyendo la producción de óxido nítrico y regula la expresión de COX-2. Banerjee et al., (2002), indican que la quercetina regula la expresión de COX-2 en macrófagos, otros investigadores indican que aumenta la expresión del COX-2 en líneas celulares de cáncer de colon humano (Al-Fayez et

al., 2006), pero no modifica la expresión en células de carcinoma de pulmón humano (Kim et al. 2005). García et al., (2007) reportan haber encontrado que la quercetina y el kaempferol reducen los niveles de iNOS y COX-2 en líneas celulares hepáticas y que la quercetina además lo hace sobre los macrófagos murinos RAW 264.7 mientras que kaempferol muestra efectos similares sobre los macrófagos de ratón. Estos efectos de los flavonoides están relacionados con la estructura química que poseen como los dobles enlaces a nivel de los carbonos 2 y 3 del anillo C y la hidroxilación en el anillo B, lo que favorece la interacción de estas moléculas con los centros activos de las enzimas, según lo señala Manach et al., (1998).

5.4 La coagulación de la sangre

La coagulación de la sangre es un proceso muy complejo donde participan una serie de proteínas que se encuentran en estado de zimógenos deben ser activadas en una cascada de reacciones dando por resultado la conversión de fibrinógeno a fibrina.

Cascada de Coagulación Clásica

La cascada de la coagulación clásica, propuesta por Macfarlane et al., (1964) y Davie et al., (1964). Este modelo convencional en "cascada" explica la fisiología de la coagulación de la sangre, según la cual, la coagulación se produce a través de la activación proteolítica secuencial de proenzimas por proteasas plasmáticas, lo que ocasiona la formación de trombina, que hidroliza el fibrinógeno originando monómeros de fibrina. Esta propuesta divide la coagulación en vía extrínseca que implica elementos de la sangre y elementos que normalmente no se encuentran en el espacio intravascular, y vía intrínseca, iniciada por los componentes que existen en el espacio intravascular, ambas vías convergen en una común con la activación del factor X (FX). En la vía extrínseca, el factor VII en el plasma se activa en presencia de su cofactor, el factor tisular (TF), formando el complejo Factor VIIa / TF (FVIIa / TF), que es responsable de la activación del Factor X. En la vía intrínseca, la activación del factor XII se produce cuando la sangre entra en contacto con una superficie que contiene cargas eléctricas negativas. Este proceso, llamado

"activación por contacto", requiere la presencia de otros componentes del plasma: precalicreína (una serinoproteasa) y cininógeno de alto peso molecular (un cofactor no enzimático), el factor XII activado activa el factor XI, que a su vez activa el factor IX. Factor IXa en presencia de factor VIII activado por pequeñas concentraciones de trombina y en presencia de iones de calcio activa el factor de coagulación X, activándose protrombina y, posteriormente formándose la fibrina (Handin et al., 2003; Zago et al., 2005), Figura 5.

Aunque el concepto de la coagulación "en cascada" fue un modelo exitoso y un avance significativo en la comprensión de la coagulación, las observaciones clínicas y experimentales más recientes muestran que la hipótesis de la cascada no refleja plenamente la hemostasia *in vivo* (Hoffman M., 2003a; Napolés et al. 2012).

En los últimos años, las deficiencias del modelo clásico se han hecho más evidentes. Por ejemplo, deficiencias de factor XII, precalicreína o de alto peso molecular quininógeno prolongan el tiempo de tromboplastina parcial activada (PTTa), pero no causan sangrado (Malý et al., 2007). Por otra parte, la deficiencia de factor IX causa la hemofilia B que causa sangría severa observada en clínica. El modelo de "cascada" no explica por qué la activación del factor X por la vía extrínseca no es capaz de compensar el deterioro de la vía intrínseca debido a la falta del factor VIII (en hemofilia A) o del factor IX (en hemofilia B) (Vine AK., 2009). Por otra parte, el grado de prolongación del TTPa en pacientes con hemofilia no predice necesariamente la extensión de la hemorragia como fue señalado por Hoffman (2003b), la actividad de la vía extrínseca de los pacientes con hemofilia es normal, como se evidencia por el tiempo de protrombina (PT) a pesar de TTPa se prolonga y se ha observado que tienen tendencia a sangrar. Es por ello que se han planteado la siguiente pregunta: ¿Por qué la vía extrínseca no compensa la disfunción de la vía intrínseca, en otras palabras, ¿por qué sangran los hemofílicos? (Gómez et al., 2011).

Muchos investigadores reconocen que el modelo de cascada tiene defectos graves en relación con el modelo de coagulación del organismo, y que las vías

intrínsecas y extrínsecas no pueden funcionar como vías independientes y redundantes como se sugiere en este modelo (Riddel et al., 2007, Monroe et al., 2009). También han reconocido en estudios sobre la coagulación, que las células juegan un papel importante en este proceso y que la hemostasia normal no es posible sin factor tisular que está relacionado con las células y plaquetas. Por lo tanto, parece lógico que al reemplazar el papel de las células por vesículas de fosfolípidos en las pruebas *in vitro* TP y TTPA ignoran el papel activo de tales células en las condiciones *in vivo* según lo reporta Monroe et al. (2009).

Por lo tanto, un modelo para la hemostasia en base a las superficies celulares fue desarrollado para sustituir el modelo de la cascada de coagulación clásico. Este nuevo modelo sugiere una interacción entre los factores de coagulación con superficies celulares específicas y parece explicar muchas cuestiones que hasta ahora no fueron explicadas por la cascada de la coagulación tradicional.

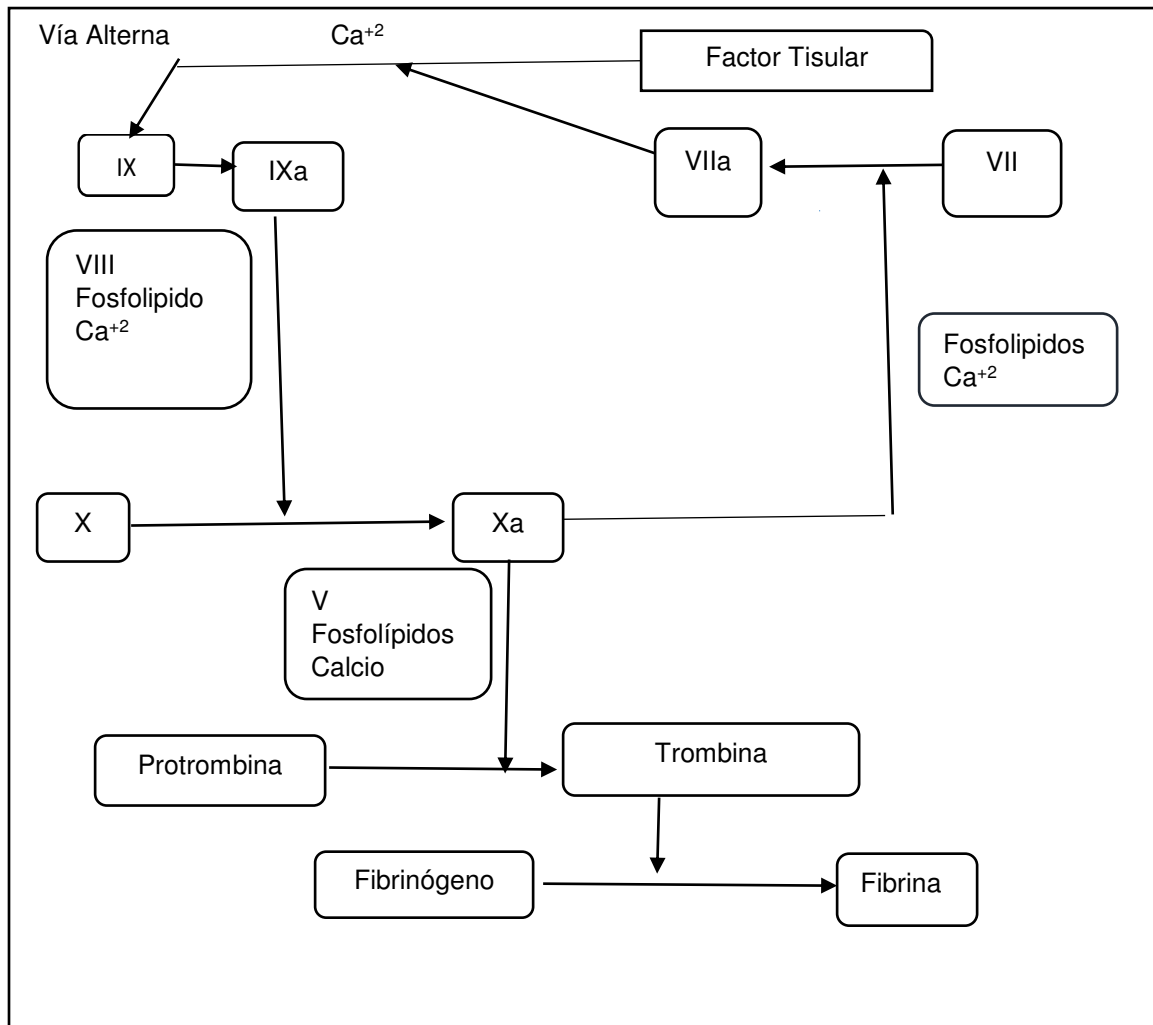


FIGURA 5. Cascada clásica de la coagulación sanguínea

Cascada de Coagulación sobre la base de las superficies celulares

Durante los últimos 20 años, los principales avances en el campo de la hemostasia han permitido obtener conocimientos de la coagulación de la sangre donde están implicadas las células que en su superficie expresan Factor tisular (TF). Esta es una proteína transmembrana que actúa como receptor para el factor VII; normalmente se encuentran en las células que no son parte del endotelio (Edgington et al. 1991; Pérez G. et al., 2007). Este conocimiento ha dado lugar a cuestionar el verdadero papel de la vía intrínseca de la hemostasia *in vivo*. La evidencia sugiere que, a pesar de la deficiencia de factor XII como resultado no ocurre un sangrado excesivo, por el contrario su escasez nos protege de la trombosis (Malý et al., 2007; Hoffman, 2003b).

Se ha propuesto un modelo basado en las superficies celulares en las que la hemostasia requiere activar sustancias procoagulantes presentes en el sitio de la lesión, y donde están involucradas las plaquetas y fibrina. En este nuevo modelo, el proceso de coagulación sanguínea se inicia por el contacto del TF a la corriente sanguínea. El TF no se expresa constitutivamente en las células endoteliales, pero está presente en las membranas de las células alrededor de los vasos sanguíneos, tales como en células de músculo liso y fibroblastos. Por lo tanto, el TF se expone al torrente sanguíneo debido a daños en el endotelio o por la presencia de los monocitos (Nemerson Y., 1988). Algunos estudios sugieren que TF también está presente como micropartículas en la sangre y proviene de diferentes tipos de células tales como leucocitos, células endoteliales y plaquetas. Estas micropartículas pueden desempeñar un papel importante en los procesos trombóticos. Es conocido, que el complejo de FVIIa /FT no sólo participa en la activación del factor X sino también factor IX. Los estudios demuestran que este complejo es esencial para iniciar la coagulación *in vivo* (Riddel et al., 2007), (Figura 6).

La comprensión actual del proceso hemostático sugiere la interrelación de los procesos físicos, celulares y bioquímicos en una serie de etapas o fases y no como se creía en dos vías (intrínsecas y extrínsecas). Las etapas de iniciación,

amplificación, propagación y terminación muestran el proceso que asegura la circulación de la sangre en una forma líquida en el endotelio vascular. Estas cuatro fases, que se resumen en Fig.8, indican los eventos que componen la teoría de coagulación actual basado en las superficies celulares según lo reportado por Hoffman et al., (2003b) y Estrada et al. (2010).

- **Fase De Iniciación**

Esta primera fase que da inicio del proceso de coagulación se produce cuando las células (subendoteliales) que producen TF en su superficie que están en contacto a los componentes de la sangre en el sitio de la lesión. El TF, una vez unido a FVII, rápidamente lo activa formando el complejo FVIIa /TF, que es responsable de la activación de pequeñas cantidades de FIX y FX (Monroe et al., 2009; Pérez et al., 2007). FXa se asocia con el factor Va (FVa), formando un complejo llamado protrombinasa en la superficie de células que secretan FT. Este complejo transforma pequeñas cantidades de protrombina (Factor II) en trombina; cantidades demasiado pequeñas para completar el proceso de formación de coágulos de fibrina, pero importante en la fase de amplificación de la coagulación (Handin et al., 2003; Vine, 2009). Existen evidencias que sugieren que estas reacciones responsables de esta fase, ocurren continuamente fuera de la vasculatura en individuos sanos. Según Hoffman M. (2003), los factores de coagulación, FVII, FX y protrombina, son capaces de atravesar el espacio entre los tejidos, es decir, pueden dejar los vasos ya que han sido detectados en la linfa pero depende principalmente de tamaño molecular. Sobre la base de estos reportes, se ha sugerido que la vía de iniciación permanece continuamente activa, con pequeñas cantidades de factores activados. Por lo que pequeñas cantidades de trombina se producirían continuamente fuera del espacio vascular, independiente de la lesión vascular. Po lo que se supone que hay una mínima de TF que se produce todo el tiempo en el espacio extravascular. El proceso de coagulación pasa a la fase de amplificación sólo cuando hay un daño vascular, y las plaquetas y el complejo FVIII/ von Willebrand (vWF), entran en contacto con el tejido extravascular donde se adhieren las plaquetas productoras de TF (Riddel et al., 2003).

- **Fase de Amplificación**

Por el gran tamaño que presentan las plaquetas y el complejo FVIII / vWF solamente pueden pasar al compartimiento extravascular cuando hay una lesión vascular. Esta lesión hace que las plaquetas se unen al colágeno y a otros componentes de la matriz extracelular en el sitio de la lesión, activándose parcialmente y formando un tapón plaquetario responsable de la hemostasia primaria (Zago et al.,2005; Boucher et al.,2009). Las pequeñas cantidades de trombina producidas por las células que expresan TF puede interactuar con las plaquetas y el complejo FVIII /vWF, lo que inicia el proceso hemostático que culmina en la formación de fibrina estable, la hemostasia secundaria, lo que consolida el tapón plaquetario inicial (Boucher et al.,2009).

La escasa cantidad de trombina generada por células que expresan TF tiene varias funciones importantes siendo la principal la activación de las plaquetas, que hacen que los receptores se unan a los factores de coagulación activados. Como resultado de esta activación, la permeabilidad de las membranas de plaquetas se altera, lo que permite la entrada de iones de calcio y la liberación de sustancias quimiotácticas que atraen a los factores de coagulación a su superficie además de liberar FVa (Pérez et al., 2007). Otra función de la trombina formada durante la fase de iniciación, es la activación de los factores FV y FVIII en la superficie de las plaquetas activadas. El complejo FVIII/vWF se disocia, permitiendo vWF para mediar en la adhesión y agregación de plaquetas en el sitio de la lesión. Además, pequeñas cantidades de trombina activan FXI sobre la superficie de las plaquetas durante esta fase. La activación de FXI por la trombina en la superficie plaquetaria explica por qué FXII no se requiere para la hemostasis normal. Al mismo tiempo, debido a los mecanismos quimiotácticos, estos factores son atraídos a la superficie de las plaquetas en la que rápidamente comienza la fase de propagación (Pérez et al., 2007; Monroe et al., 2009).

- **Fase de Propagación**

La fase de propagación se caracteriza por la migración de un gran número de plaquetas al sitio de la lesión y la producción de complejos enzimáticos como el protrombinasa en la superficie de las plaquetas activadas (Vine AK., 2005). En primer lugar, el FIXa durante la fase de iniciación puede ahora unirse a FVIIIa en la superficie de las plaquetas activadas para formar un complejo. Una cantidad adicional de FIXa también puede ser producido por FXIa unidos a plaquetas. Como FXa no puede movilizarse de células que expresan TF a las plaquetas activadas, una gran cantidad de FXa debe ser generada directamente en la superficie de las plaquetas por el complejo FIXa/FVIIIa (Hoffman M., 2003). Por último, FXa se asocia rápidamente con FVa unido a las plaquetas durante la fase de amplificación que resulta en la formación del complejo de protrombinasa que convierte grandes cantidades de la protrombina en trombina. Este es responsable de la escisión del fibrinógeno en monómeros de fibrina que, a su vez, se polimerizan para formar el tapón de plaquetas (Riddel et al., 2007).

- **Fase De Terminación**

Una vez que un coágulo de fibrina se forma en la lesión, el proceso de coagulación debe limitarse a la zona de la lesión para prevenir la oclusión trombótica de los vasos sanguíneos. Es por ello, que cuatro anticoagulantes naturales están implicados en el control de la propagación de la activación de la coagulación; el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), proteína C (PC), la proteína S (PS) y la antitrombina III (ATIII).

TFPI es una proteína secretada por el endotelio, que forma un complejo cuaternario, TF/FVIIa/FXa/TFPI, que inactiva a los factores activados de coagulación limitando el proceso (Malý et al., 2007). Las proteínas C y S son dos anticoagulantes naturales que tienen la capacidad de inactivar los factores FVa y FVIIIa (Valen et al., 1996). La PC es una glicoproteína de plasma dependiente de vitamina K, cuya síntesis cuando se activa, promueve la proteólisis de los factores Va y VIIIa (Furie et al., 2006). PC es activada por la trombina, que se une a la proteína transmembrana,

trombomodulina (TM) en la superficie de las células endoteliales intactas. La actividad de PC se incrementa con el otro inhibidor PS, que es también dependiente de la vitamina K. En el plasma humano, aproximadamente el 30% de PS circula como proteína libre, que funciona como un cofactor para PC activada. Otro anticoagulante natural, Antitrombina III (ATIII), inhibe la actividad de la trombina y otras serina proteasas tales como FIXa, FXa, FXIa y FXIIa. Las células endoteliales producen una variedad de glicosaminoglicanos, tal como la heparina (heparan sulfato) que presenta sitios con alta afinidad para unirse a la ATIII activándola y así lograr la inactivación rápida de la trombina según lo reporta Franco (2001). La heparina se une a la antitrombina III (ATIII) a nivel de la lisina produciendo cambios conformacionales de la proteína que expone sus sitios de unión a la trombina y a otras serinoproteasas. Para que la inactivación de la trombina sea eficiente se requiere la formación del complejo terciario de ATIII - heparina - trombina según lo manifiesta Tollefsen (1995).

Las ventajas del nuevo modelo de la coagulación, es capaz de explicar algunos aspectos clínicos de la hemostasia que el modelo de cascada clásica no lo hace. Este nuevo modelo da una mejor comprensión del proceso de coagulación in vivo y es más consistente con las observaciones clínicas de varios trastornos de la coagulación (Ferreira et al., 2010; Gómez et al., 2011).

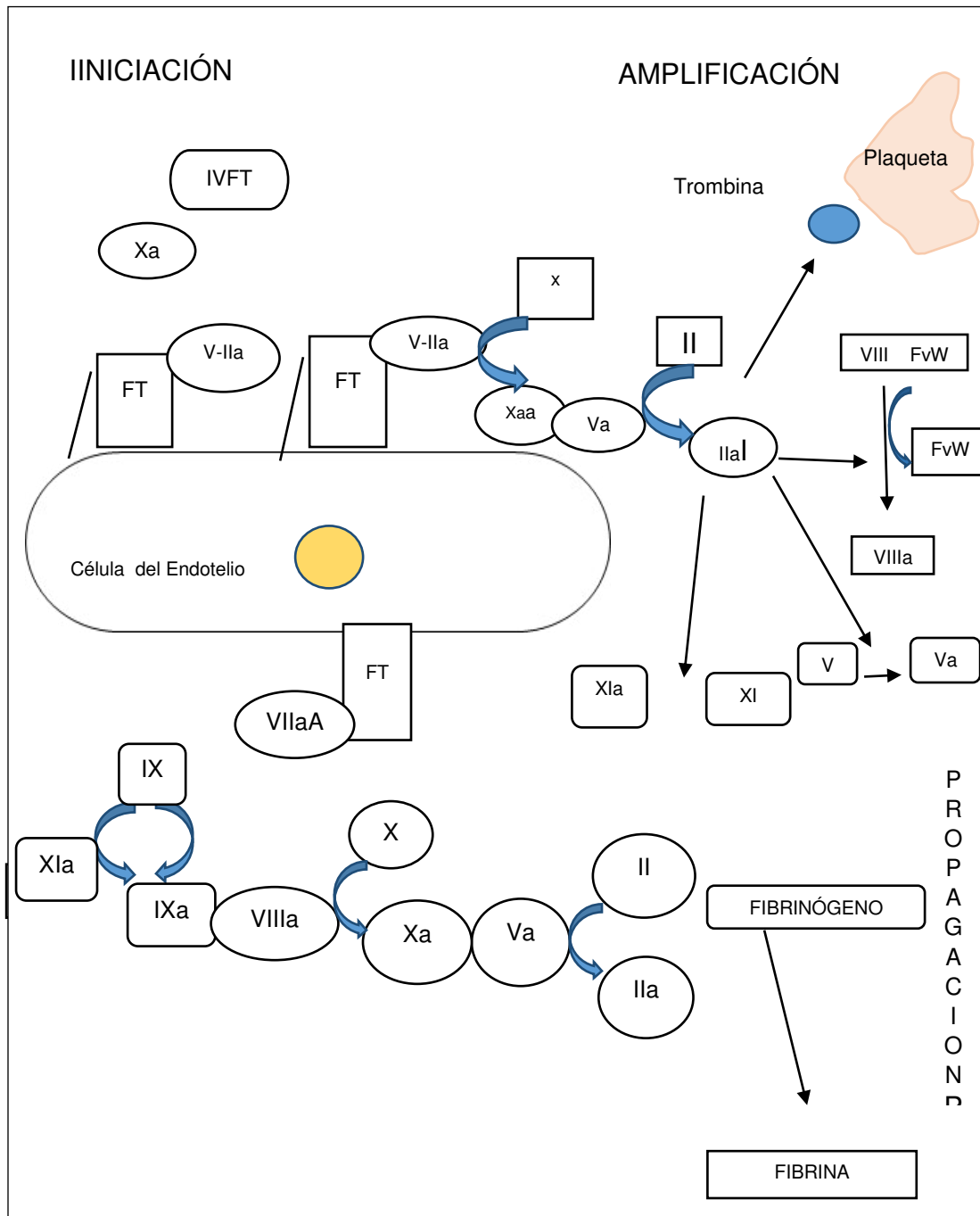


FIGURA 6. Nuevo modelo celular de la hemostasia (Vine ak., 2009).FvW.: Factor von Willebrand.Factor tisular: FT. "Plaqueta: P.Fb: Fibrinógeno. Factores de la coagulación activados: Fa.Ejemplo: V activado: Va.Inhibidor de la vía Factor Tisular activado: IVFT.

ANTICOAGULANTES NATURALES

Los anticoagulantes son un grupo de sustancias de distinta naturaleza química relacionados por su efecto biológico, que pueden clasificarse en:

Los anticoagulantes

El sistema de la coagulación debe estar regulado para mantener la hemostasia, y evitar la generación de excesivas cantidades de trombina. Ello se lleva a cabo por acción de sistemas anticoagulantes naturales, presentes en el endotelio vascular, en el que los más importantes son el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), la antitrombina III y el sistema de la proteína C (Boucher et al.,2009). El TFPI se une al complejo FT/FVII e impide la fase inicial de la coagulación, su principal lugar de producción son las células endoteliales. La antitrombina III inhibe la trombina y otros factores de la coagulación como FIXa, FXa, FXIa y FXIIa. Por último, el sistema de la proteína C, trombina, trombomodulina y el receptor endotelial hacen posible se genere dentro del vaso un ambiente libre de inflamación y de coagulación según lo indica Carrillo et al. (2013).

La heparina es un glucosamino glicano sulfatado, que ejerce su acción anticoagulante mediante la estimulación de la actividad de la antitrombina III (ATIII), por la presencia de un pentasacárido que le da alta afinidad en su estructura. Solamente un tercio de las heparinas presentan esta secuencia, la interacción de la heparina con la ATIII produce cambio conformacional que acelera su acción inhibitoria de los Factores de la coagulación como el FIIa, FXa y IXa, siendo la Trombina la más sensible. Para que se realice la inhibición debe formarse el complejo ternario ATIII-Heparian-Factor activado. El F-Xa se inactiva por unión a la antitrombina, (Aguilar, 2008).

La fibrinólisis es un mecanismo esencial para eliminar los coágulos de fibrina durante la fase de cicatrización, así como remover los coágulos intravasculares para impedir la trombosis. Con la fibrinólisis se elimina la fibrina no necesaria para la hemostasia con el fin de reparar el vaso y restablecer el flujo vascular.

El efector final del sistema es la plasmina, que degrada la fibrina en productos de degradación (PDF y el dímero D). La plasmina es producida a partir de un precursor inactivo, el plasminógeno, por acción de dos activadores del plasminógeno: activador tisular (t-PA) y activador tipo urocinasa (u-PA). La regulación de los activadores tiene lugar por la acción de inhibidores (PAI), de los que el más relevante es el PAI-1, mientras que la plasmina circulante es rápidamente inhibida por la α 2-antiplasmina, lo que evita una fibrinólisis sistémica. La plasmina degrada el polímero de fibrina en pequeños fragmentos que son eliminados por el sistema de limpieza monocito-macrófago (Aguilar, 2008; Caballero et al., 2011)

Existen anticoagulantes de acción directa, lo que son capaces de inhibir por sí solos la cascada de la coagulación. Ejemplos: inhibidores directos de trombina hirudina, argatroban.

La hirudina natural se aisló por primera vez en 1950, a partir de las glándulas salivares de la sanguijuela (*Hirudo medicinalis*). Sin embargo, su limitada disponibilidad supuso un impedimento para su aplicación terapéutica, siendo en estos últimos años cuando la ingeniería genética ha permitido obtener formas recombinantes de la hirudina natural (r-hirudina) en cantidad suficiente para su uso clínico. Cuéllar et al., 2000, reportó que habían registrado en España dos fármacos de origen recombinante derivados de la hirudina natural, lepirudina y desirudina, que tiene más ventajas que las heparinas. Las hirudinas en general son inhibidores potentes y altamente específicos de la trombina, con la que forman un complejo estequiométrico 1:1, no covalente, pero muy estable y prácticamente irreversible, bloqueando así su centro activo e impidiendo estéricamente el acceso de sustratos naturales y sintéticos al sitio catalítico de la trombina. A diferencia de la heparina, bloquean de forma directa la actividad trombogénica tanto de la trombina libre como

de la unida al coágulo; no requieren la participación de factores endógenos y actúan de forma independiente de la antitrombina III y del cofactor II de la heparina, de manera que se consigue un efecto más estable sobre la coagulación con respecto a la heparina.

El argotrabán es un derivado de la arginina que se une reversiblemente al centro activo de la trombina y no requiere de ATIII para realizar su efecto. Este anticoagulante inhibe a la trombina e inactiva todas las acciones que presenta como la formación de fibrina, activación de los FV, FVIII y FXIII, la agregación de plaquetas proteína C, pero no tiene ningún efecto sobre otras serina proteasas como FX, plasmina, kallicreina y tripsina.

La saliva del vampiro común, *Desmodus rotundus*, tiene la capacidad de lisar coágulos sanguíneos. La lisis está mediada por activadores de plasminógeno que no rompen directamente a las fibras de fibrina sino que lo hace a través de la activación del precursor de la plasmina; ésta última es la enzima encargada de degradar a la fibrina (Alagón, 2001).

Campbell et al., 1941, investigadores de la Universidad de Wisconsin, aislaron y caracterizaron el agente hemorrágico contenido en el trébol dulce. Estos investigadores establecieron que este anticoagulante era el 3,3'-metilenobis-(4-hidroxycumarina), que en la actualidad se conoce como dicoumarol o bishidroxycumarina, y que es el primer compuesto de esta familia de sustancias en ser comercializado. Posteriormente, Link y Campbell continuaron desarrollando anticoagulantes sintéticos más potentes basados en la estructura molecular del dicoumarol, con la finalidad de utilizarlos como venenos contra roedores, hasta que obtuvieron en 1948, la warfarina. El nombre de warfarina proviene del acrónimo WARF, de Wisconsin Alumni Research Foundation, más la terminación arina, que indica su relación con la cumarina. La Warfarina se registró para uso comercial como raticida por primera vez en los Estados Unidos en 1948 y debido a que en 1951 un soldado norteamericano intentara suicidarse sin éxito con esta droga, comenzaron los estudios para establecer su utilidad como anticoagulante terapéutico (Quintero,

2010). En 1954, fue aprobado su uso clínico en humanos. Sin embargo, el mecanismo de acción de este fármaco se desconoció hasta 1978, cuando Furie et al., (1990), demostró su acción inhibitoria sobre el metabolismo de la vitamina K (VK) en el hígado. Los derivados cumarínicos son antagonistas de la VK, debido a que actúan sobre los factores de coagulación que dependen de esta vitamina para su activación. Algunos de estos factores poseen actividad procoagulante (II, VII, IX y X) y otros por el contrario, funcionan como anticoagulantes naturales (proteína C, proteína S y proteína Z). Para que estas proteínas se vuelvan fisiológicamente activas, se requiere un cambio conformacional en su estructura, que consiste en la carboxilación de los residuos de ácido glutámico de la cadena N terminal, formándose así el ácido γ -carboxiglutámico (Gla), pero para que estas reacciones se realicen requieren que se realice el ciclo de la vitamina K para formar la forma activa de esta vitamina llamada hidroquinona (KH₂) que participa como coenzima de la γ -glutamyl-carboxilasa reacción enzimática que genera γ -carboxiglutamato (Gla) y 2,3 epóxido de VK. El mecanismo de acción de la warfarina reside en su capacidad de interferir con el ciclo de conversión de la VK, lo que impide la γ -carboxilación de los factores de coagulación, dando como resultado la producción hepática de factores acarboxilados o parcialmente carboxilados con actividad coagulante reducida (Ansell et al., 2008).

5.5 *Oenothera rosea*,

Hierba perenne, erecta o ascendente, de 10-20 cm de alto, ramificada en la base, más o menos estrigulosa. Hojas oblongo ovadas o elípticas, atenuadas en la base sobre el peciolo, enteras o sinuado denticuladas. Flores dispuestas en la axila de las hojas formando grupos racemiformes. Hiparito estriguloso. Pétalos rosados o lilacinos, anchamente obovados, de 5-10 mm de longitud, Figura 7.

Se encuentra distribuida en Perú y Bolivia, y desde el suroeste de Estados Unidos de América hasta Argentina. Esta planta crece desde los 600 a 3 900 msnm,

es conocida como “chupasangre”, “sanguinaria”, y se utiliza principalmente para resolver los hematomas, cicatrizante, antiinflamatorio y problemas gastrointestinales. En México se le conoce como “hierba del golpe” y “yawar socco”, (Céspedes et al., 2010).

Es una planta utilizada en forma tradicional por los habitantes de la sierra y poco en Lima, para las lesiones en la piel como raspones, golpes y quemaduras. Se emplean las flores, hojas y tallos para la elaboración de un emplasto que se aplica directamente sobre la lesión, o bien, la emplean las partes aéreas para la preparación de una infusión que se toma como agua de tiempo, (Villena et al., 2012)



Figura 7. *Oenothera rosea* “chupasangre”

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Materiales Biológicos.

Muestra: Hojas de *Oenothera rosea*.

Enzimas coagulantes: Trombina bovina liofilizada Sigma Aldrich y

Veneno de serpiente *Lachesis muta*, donado por el Laboratorio de Biología Molecular de la Fac. Ciencias Biológicas UNMSM.

Sustratos: Fibrinógeno bovino Sigma, Plasma fresco humano citratado (procedente de donantes voluntarios de 20 a 30 años de edad sin problemas hematológicos)

Materiales de Laboratorio

Tubos de ensayo de diferentes medidas.

Pipetas graduadas.

Embudos de vidrio.

Espátulas.

Baguetas.

Lunas de reloj.

Gradillas.

Placas escavadas de porcelana.

Pipetas semiautomáticas 5-50 ul; 10-100 ul; 10-200 ul; 100-1000 ul.

Papel de filtro Whatman No. 1 y 4.

Equipos

Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific serie GENESYS 10S.

Balanza analítica Sartorius sensibilidad 0,0001g.

pH metro Thermo Scientific Orion.

Estufa de secado Binder.

Baño María BioLab.

Cocina eléctrica de dos hornillas.

Centrifuga 6 tubos, Marca: Boeco - Modelo: 800D, 4000RPM

Cámara cromatográfica.

Lámpara UV 254-366 nm.

Cámara fotográfica Canon 16 Mega pixeles, 5X Zoon óptico.

Reactivos

- Solventes para Extracción de Compuestos fenólicos y Pruebas de Solubilidad: etanol 96 °, y metanol, cloroformo, acetona y n-hexano de grado para análisis.
- Reactivos para Marcha Fitoquímica: Reactivos de Molish, Ninhidrina, Cloruro férrico Sigma Aldrich, virutas de magnesio metálico, ácido sulfúrico 97%, HCl cc y gelatina en polvo.
- Reactivos para actividad medir alteraciones de la coagulación: cloruro de sodio 0.9% Merck, Buffer Tris HCl 50 mM pH 7,4, citrato de sodio al 3,8% cloruro de calcio Merck 25 mM.
- Actividad Amidolítica: N- α Benzoil L-arginina p-nitroanilida (BapNA) Sigma Chem., Buffer Tris HCl 0,05 M pH 8,1, ácido acético al 60%, trombina bovina,

veneno crudo de *Lachesis muta*.

- Cuantificación de Flavonoides: Cloruro de aluminio Sigma Chem. al 10%, Acetato de potasio Merck 1M, Rutina Sigma Aldrich, (flavonoide estándar).
- Cromatografía en Capa Fina: Cromatofolios AL Merck 20x20 de celulosa, etanol 96 ° y agua destilada.
- Reactivos de desplazamiento: Metanol grado para análisis, Cloruro de Aluminio 5% Sigma Aldrich., metóxido de sodio 2.5 % y Ácido clorhídrico 50%.

6.2 MÉTODOS

Recolección del material biológico (cuerpo vegetal)

La muestra de hojas de *Oenothera rosea Aiton* fueron recolectadas en distrito de Matucana, provincia de Huarochirí departamento de Lima, a 2 378 m sobre el nivel del mar.

- Secado

Se realizó la separación de las hojas y tallos de las plantas las cuales fueron colocadas en un lugar fresco y ventilado hasta que se sequen completamente.

- Herborización

La planta completa fue colocada en prensa para lograr su herborización y posteriormente identificada taxonómicamente en el Museo de Historia Natural UNMSM.

Elaboración del Extracto Alcohólico

Las hojas secas fueron pulverizados y colocados en un frasco oscuro de boca ancha al que se le agregó etanol de 96° hasta que cubra toda la muestra por un periodo de 7 días, luego se filtró utilizando papel filtro y la muestra fue recibida en un

matraz. Posteriormente se realizó la evaporación del solvente utilizando una estufa a 37°C, hasta su secado total (Domínguez, 1973).

Pruebas Fitoquímicas

- Pruebas de Solubilidad

Con la finalidad de comprobar la solubilidad del extracto alcohólico se sometió a la prueba con solventes de diferente polaridad: agua destilada, metanol, etanol, cloroformo, acetona y N-hexano. Se pesó 100 mg del extracto alcohólico y se colocó en tubos de ensayo a los cuales se les agregó 1 ml de cada solvente para evaluar su solubilidad, Lock, (1994), Tabla 2.

- Marcha Fitoquímica

Se realizó pruebas cualitativas para determinar la presencia de los metabolitos secundarios presentes en los extractos según la metodología publicada por Lock, (1994), Fig.10.

- Grupos Fenólicos: Cloruro Férrico

La disolución de cloruro férrico forma complejos coloreados con los fenoles indicando su presencia. Se utilizó una placa escavada donde se colocó 0.3 ml. del extracto alcohólico 1mg/ml y se agregó 0,1 ml de FeCl_3 al 1% y se observó la coloración desde verde oscuro, hasta azul negruzco; indicativo de la presencia de compuestos fenólicos, Fig.10. La misma técnica se realizó con las fracciones (Fig. 11A).

- **Flavonoides: Reacción Shinoda**

En la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el HCl_{cc} , dando como productos al H_2 , que es eliminado en forma de gas y el MgCl_2 , que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado. Si en estas condiciones se observa la aparición de coloración rojiza hasta violeta, la reacción es positiva para compuestos con el núcleo de la γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, xantonas e isoflavonoides), Fig.10.

Se utilizó una placa excavada donde en uno de los pocillos se colocó 0,3 ml del extracto alcohólico a una concentración de 1mg/ml, ligeramente amarillo, y se agregó virutas de magnesio metálico y unas gotas de HCl_{cc} . La misma técnica se realizó con las fracciones (Fig.11B).

- **Saponinas: Método Afrosimétrico o de la Espuma**

Este método hace referencia al nombre de saponina que proviene del latín, Sapon = jabón, y evalúa las propiedades de las saponinas de disminuir la tensión superficial y formar espuma en soluciones acuosas, Fig.10.

Se colocó el material seco y pulverizado en un tubo de ensayo, se le agregó agua destilada hasta una concentración de 1%, se agitó por 1min y se dejó reposar para evaluar la formación y permanencia de la espuma. Si la espuma permanece por 30 min indica la presencia de saponinas.

- **Taninos: Gelatina al 1%**

Los taninos precipitan a las soluciones de proteínas dando como resultado desde opalescencia blanca hasta precipitado, Fig.10.

Se colocó 1 ml de solución acuosa de gelatina al 1% en un tubo de ensayo al que se le agregó unas 30 μ l del extracto alcohólico 5 mg/ml en agua destilada. La reacción es positiva ante la presencia de turbidez o precipitado.

- **La prueba de Molish**

Es una reacción general para carbohidratos detecta la presencia de hidratos de carbono en una muestra; se basa en la formación de furfural o derivados de éste, originados por el ácido sulfúrico H_2SO_4 que provocan la deshidratación de los azúcares para obtener el furfural que se combina con el α -naftol sulfonato originando un complejo púrpura. Es una reacción muy sensible puesto que soluciones de glucosa al 0,001% y sacarosa al 0,0001% dan positiva la prueba, Fig.10.

También sirve para el reconocimiento general de carbohidratos donde polisacáridos y disacáridos se hidrolizan formando monosacáridos formando un color púrpura violeta.

Se colocó 1 ml del extracto alcohólico 1mg/ml o de la Fase acuosa se agregó 2 gotas de alfa naftol y se dejó caer por las paredes del tubo H_2SO_4 cc y se observó en la interfase la formación del anillo violeta que indicó la presencia de carbohidratos.

- **Reacción De Ninhidrina**

Todas las sustancias que presentan al menos un grupo amino y uno carboxilo libre, reaccionaran con la ninhidrina. La positividad se manifiesta por la aparición de un color violáceo o amarillo (prolina e hidroxiprolina). Debido a que los alfa aminoácidos, poseen esta característica, la reacción sirve para identificarlos. Algunas soluciones de amonio y aminos, dan la coloración característica, aparentemente debido a una oxidación y reducción intramolecular de la ninhidrina en presencia de amoníaco.

A los tubos de ensayo se colocó 1 ml de extracto alcohólico y la fase acuosa, luego se adiciono a cada uno 1 ml de reactivo de Ninhidrina 0,01% y se calentaron

los tubos en baño de agua a ebullición por 10 min para observar los colores desarrollados, Fig.10.

Aislamiento de compuestos fenólicos por cromatografía en capa fina (CCF)

Se tomó 500 mg/ml del extracto etanolico de las hojas de *O.rosea* y se disolvió en agua, se sembró con un tubo capilar sobre la placa cromatográfica de 20x20 cm de celulosa y con el sistema etanol: agua (1:5). En la cámara cromatográfica, se colocó la placa y se dejó para que se realice la corrida, se extrajo la placa de la cámara cromatográfica, se dejó secar y se observó con luz ultravioleta 255-366 nm. Las bandas detectadas fueron raspadas del cromatograma y resuspendidas en agua destilada para ser evaluadas con las reacciones para fenoles, flavonoides y tiempo de recalcificación de plasma humano citratado. Las fracciones que mostraron efecto anticoagulante se les hizo otras pruebas utilizando fibrinógeno bovino, BApNA, trombina bovina y veneno de serpiente *L.muta*. Luego se hizo otra cromatografía con las mismas condiciones indicadas anteriormente pero solamente con las dos fracciones anticoagulantes y Rutina como estándar.

Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó mediante el ensayo de Willet modificado por Amzad (2011). La fase acuosa del extracto etanólico y las fracciones F-2 y F-5 fueron disueltas en etanol-agua. Se colocaron en diferentes tubos de ensayo volúmenes de 0,5 ml de cada una de las muestras, 0,5 de cloruro de aluminio al 10%, 0,1 ml de acetato de potasio 1M y 4,3 ml de agua destilada, luego de ser mezclados se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para medir la absorbancia a 415 nm. De la misma forma, se preparó la curva de calibración utilizando Rutina como flavonoide estándar, en concentraciones 10 ug hasta 100 ug/ml (Fig.8).

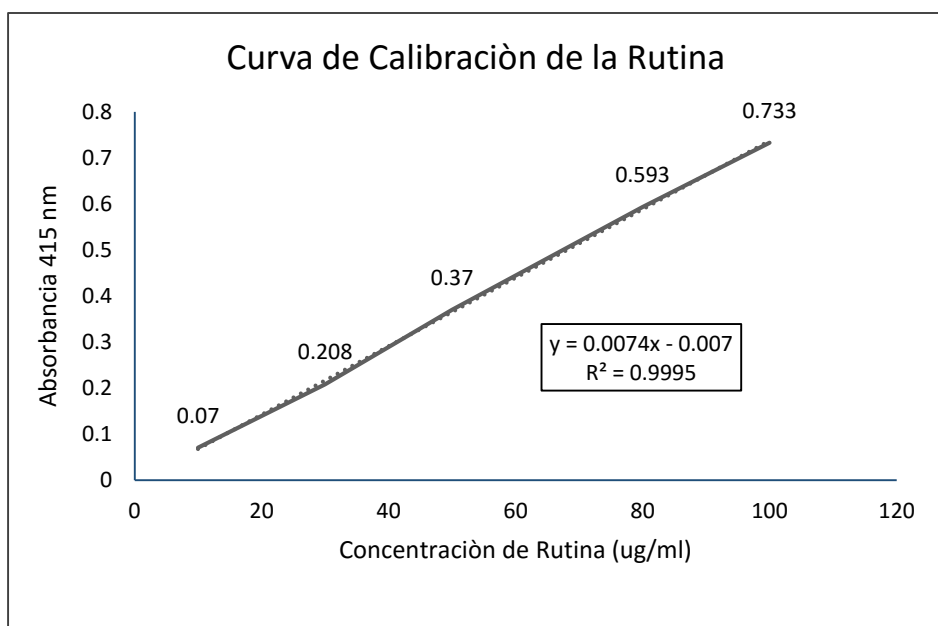


FIGURA 8. Curva de calibración de Rutina

Pruebas bioquímicas de evaluación de la actividad anticoagulante.

- Determinación del efecto anticoagulante *in vitro*.

Consistió en realizar pruebas que determinen la acción anticoagulante sobre el plasma humano citratado.

Preparación de las muestras

Se pesó 100 mg del extracto etanólico y se agregó 1 ml de agua destilada, se disolvió y filtró obteniéndose la fase acuosa.

Obtención del plasma humano citratado.

Para ello se extrajo sangre venosa en un tubo de ensayo y se mezcló con el citrato de sodio al 3,8% en la porción 1:9, y se centrifugo a 3 000 r.p.m. durante un tiempo de 10 min. Luego se retiró el plasma a otro tubo.

Determinación del tiempo de recalcificación del plasma humano fresco citratado (Copley ,1973)

Se colocó en un tubo de ensayo Nro.1: 0,2 ml. de plasma humano citratado fresco y 0.1ml de NaCl 0.9% se preincubó por 3 minutos y luego se agregó y 0,1 ml del CaCl_2 25 mM llevándose al baño maría a 37°C para tomar el tiempo normal que demora en coagular en segundos (s) .Luego, iguales volúmenes de veneno y extracto fueron preincubados por 10 minutos a 37°C y 0,1 de esta mezcla se les colocó en el tubo Nro.1, se agitó y se colocó en el baño maría a 37°C para determinar el tiempo que demora en coagular en segundos. Esta prueba se realizó también con la fase acuosa y las fracciones F-2 y F-5.

Efecto de la fase acuosa y de las fracciones 2 y 5 sobre la actividad coagulante de la trombina bovina.

Se preparó trombina 1U /ml (0.020 mg/ml) en solución de cloruro de sodio al 0,9%. Además se disolvió fibrinógeno bovino 5mg/ml en buffer Tris HCl 50 mM pH 7,4. Se colocó 0,2 ml de fibrinógeno y 0,1 ml de NaCl 0,9%, se pre-incubó por 3 minutos a 37°C y se agregó 0,1 ml de trombina 1U/ml. Se tomó el tiempo de coagulación en segundos como control. Por otra parte, en un tubo se colocó 2U /ml de trombina y 120 mg de flavonoide/ml de la fase acuosa y se pre-incubó por 10 minutos a 37°C. De esta muestra tomó 0,1 ml y se agregó al tubo que contenía 0,2 ml de solución de fibrinógeno más 0,1ml de NaCl 0,9% y se incubó a 37°C para

medir el tiempo en que se produjo la coagulación. De la misma manera se procedió con las fracciones F-2 y F-5.

Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de trombina utilizados.

El porcentaje de inhibición coagulante se halló por la sustracción 100 menos el % de actividad enzimática coagulante de cada una de las muestras (100 - %AE coagulante).

Efecto de la fase acuosa y las fracciones 2 y 5 sobre la actividad coagulante del veneno crudo de *L. muta*.

Se preparó 0,072 mg/ml de veneno de serpiente. Además se disolvió fibrinógeno bovino 5mg/ml en buffer Tris HCl 50 mM pH 7,4. En un tubo se colocó 0,2 ml de fibrinógeno y 0,1 ml de NaCl 0,9% se pre-incubó por 3 minutos a 37°C y se agregó 0,036 mg/ml de veneno y se incubó a 37°C, anotando el tiempo que demoró en coagular, como control. Por otra parte, en otro tubo se colocó 0,072 mg/ml de veneno y 120 mg de flavonoide/ml de fase acuosa y se pre-incubó por 10 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de este tubo se sacó 0,1 ml y se agregó a otro tubo que contenía el fibrinógeno y NaCl 0.9%, y se tomó el tiempo en que demoró en coagular en segundos. De la misma manera se procedió con cada una de las fracciones F-2 y F-5. Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizados.

Se consideró que 1mg/ml de veneno crudo de *L. muta* tiene 1,62 mg/ml de proteína leído a 280 nm, según lo reportado por Yarlequé et al. (2012).

El porcentaje de inhibición coagulante se halló por la sustracción: 100 menos el % de actividad enzimática coagulante de cada una de las muestras (100 - %AE coagulante).

Efecto de la fase acuosa y las fracciones 2 y 5 sobre la coagulación del plasma humano por el veneno de *L. muta* (Copley).

Se colocó en un tubo de ensayo Nro.1 0,2 ml. de plasma fresco humano citratado y 0,1 ml de solución fisiológica para pre-incubar por 5 minutos. También se pre-incubó la mezcla fase acuosa 120 mg/ml y veneno de serpiente 0,072 mg/ml en proporción 1:1, al baño maría a 37°C por 10 min. Se retiraron los tubos y al tubo Nro.1 se le agregara 0,1 ml de la mezcla se agitó y se colocó nuevamente en el baño maría a 37°C para observar el tiempo que demoró en coagular. De la misma manera se procedió con las F- 2 y F-5.

Se consideró que 1mg/ml de veneno crudo de *L. muta* tiene 1,62 mg/ml de proteína leído a 280 nm, según lo reportado por Yarlequé et al. (2012).

El porcentaje de inhibición coagulante del plasma humano se halló por la sustracción: 100 menos el % de actividad enzimática coagulante de cada una de las muestras (100 - %AE coagulante).

Actividad amidolítica

Se determinó por el método de Erlanger (1961), midiendo la hidrólisis que producen el veneno crudo de *L.muta* sobre el sustrato cromogénico benzoil-arginil-p-nitroanilida (BAPNA). La mezcla de reacción contenía 1 ml de BAPNA 0,9 mM, 0,9 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,1 y 0,1 ml de veneno (1mg/ml) incubado con la fase acuosa del extracto alcohólico. Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C se adicionó 1 ml de ácido acético al 60% y la liberación de p- nitroanilina fue medida a 405 nm. La actividad específica fue calculada por los moles de p-Nitroanalina liberados por minuto por un miligramo de proteína (U/mg). La misma prueba se realizó con las fracciones F-2 y F-5.

. Se consideró que 1mg/ml de veneno crudo de *L. muta* tiene 1,62 mg/ml de proteína leído a 280 nm, según lo reportado por Yarlequé et al. (2012).

Con la hidrólisis total del 1 ml de BApNA 0,9 mM se obtuvo una lectura de absorbancia igual a 1 506, valor útil para hallar la actividad específica amidolítica (AEA).

El porcentaje de inhibición coagulante se halló por la sustracción: 100 menos el % de actividad específica amidolítica de cada una de las muestras (100 - % AEA).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Excel 2013, para obtener la desviación estándar para las pruebas realizadas con tres repeticiones (n=3).

Determinación de las estructuras químicas por espectrofotométrica UV-VIS de los compuestos fenólicos aislados

Los espectros UV –Vis de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Contienen un sistema benzoilo del anillo A y a un sistema cinamoílo del anillo B el cual facilita el análisis de flavonoides, puesto que el espectro ultravioleta del benceno presenta una muy buena estructura debido a la interacción de vibraciones y electrónica de sus niveles de energía. Este cromóforo, presenta tres bandas de absorción a 184, 202 y 255 nm (Cooper 1980). Cuando el anillo presenta sustituciones, puede por consiguiente, haber conjugaciones, las cuales van a presentar desplazamiento batocrómicos en el espectro UV y proporcionar información estructural que permita identificar sus patrones de oxidación y tipo de flavonoide (Mabry et al., 1970; Lock O, 1994; Andersen et al., 2006).

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm que corresponde al anillo A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción.

La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O- sustituidos en 330- 360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm (Lock, 1994). La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaOMe), solución de cloruro de aluminio (AlCl_3) y solución de cloruro de aluminio con HCl (Mabry et al., 1970).

Todas las muestras primero fueron leídas en metanol absoluto y luego con los reactivos de desplazamiento: Cloruro de aluminio al 5% en metanol absoluto sin y con ácido clorhídrico al 50% y solución de metóxido de sodio al 2,5% en metanol absoluto en un rango de 200-500 nm y a cada tubo que contenía 1 ml de muestra se le colocó primero 0,1 ml de cloruro de aluminio al 5% y después de 2 minutos se leyó, luego se agregó 0,1ml de ácido clorhídrico al 50%, 2 minutos de reposo y se leyó nuevamente. A otro tubo que contenía la muestra en metanol absoluto se le agregó 0,1 ml de metóxido de sodio reposó por 2 min y se leyó para obtener sus espectros. Se leyeron los espectros de Rutina como estándar de flavonoide.

Los espectros obtenidos fueron comparados con espectros para la identificación de flavonoides publicados por Mabry et al. (1970).

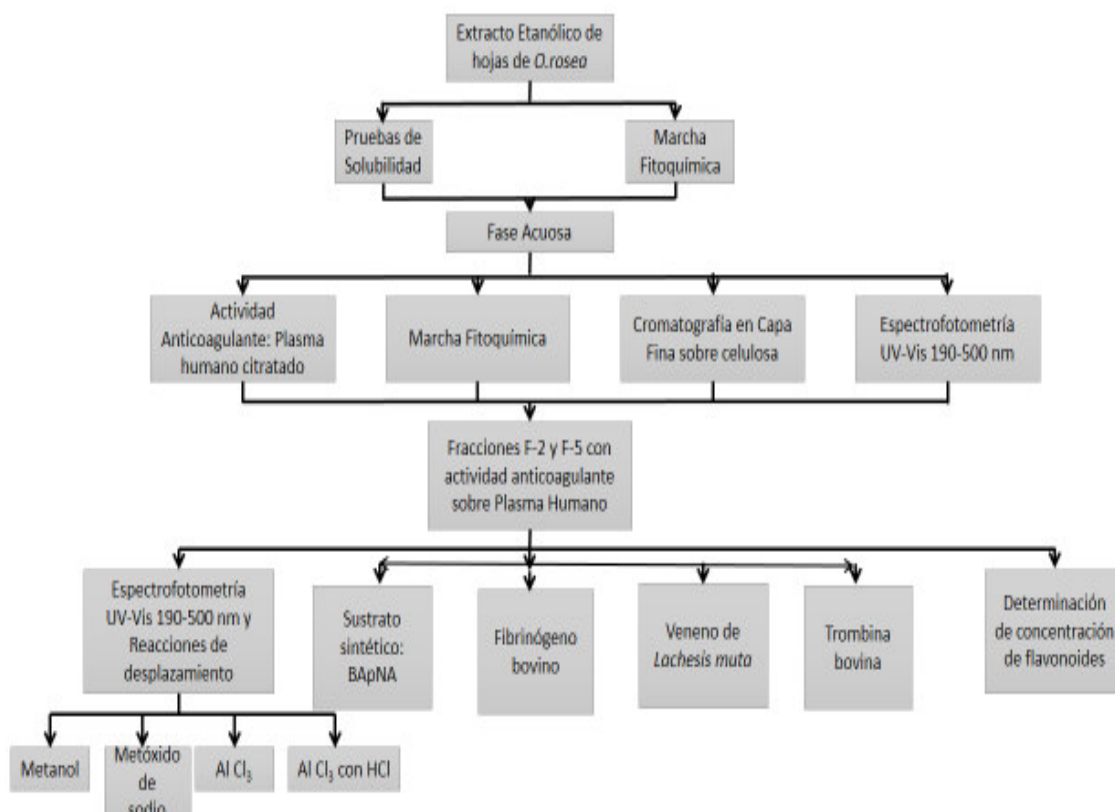


FIGURA 9. Diagrama de flujo de la metodología.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Solubilidad del extracto alcohólico de *O. rosea*

Mediante la prueba de solubilidad se comprobó que los principales componentes del extracto alcohólico de las hojas de *O.rosea* son de naturaleza medianamente polar y polar como se puede observar en la Tabla Nro. 1 ya que solamente se disolvieron en metanol, etanol y agua que son solventes con las características de polaridad mencionadas. En este trabajo se prefirió trabajar con la parte del extracto alcohólico capaz de disolverse en agua, ya que las pruebas a que fueron sometidas las muestras incluían acción sobre proteínas y enzimas a las cuales por su naturaleza, los solventes orgánicos podrían alterar, estas requieren de condiciones fisiológicas. Sin embargo, los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos ino sustituidos o azúcares son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona y agua. Por otro lado, las agliconas menos polares como isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en solventes apolares tales como éteres y cloroformo.

TABLA 2. Solubilidad del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea*

Solvente	Constante Dieléctrica (ϵ)	Solubilidad de Extracto Etanólico
Agua destilada	80,10	+ +
Metanol	33,00	+ +
Etanol	24,50	+++
Acetona	20,70	--
Cloroformo	4,80	--
n-hexano	1,89	--

Muy soluble: +++

Medianamente soluble: + +

Insoluble: --

Cuando hablamos de solubilidad, debemos tener en cuenta que los solventes presentan una medida que les facilita o dificulta separar dos moléculas de soluto, esta es la constante dieléctrica (ϵ), que es una medida de polaridad del solvente y se relaciona con la capacidad que tiene de disolver al lograr separar iones de soluto de carga opuesta. Cada solvente presenta un máximo de solubilidad a una constante dieléctrica determinada. Con frecuencia se mezcla dos solventes con el objeto de obtener una determinada constante dieléctrica que permita disolver solutos. Así la propiedad dieléctrica de una mezcla como el alcohol-agua puede aproximarse con el promedio ponderado de las propiedades de los componentes puros.

Beltrán et al., 2013, reportan que en la extracción de fenoles totales de setas comestibles de tipo *Pleurotus sp*, la concentración más alta de estos metabolitos se

encuentran en el extracto acuoso y etanólico con valores de tres y cinco veces mayores que los obtenidos en solventes de menor polaridad, encontrándose una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la constante dieléctrica de los solventes utilizados. En nuestro caso la extracción que hicimos fue con etanol ($\varepsilon = 24,50$) y luego de la evaporación el extracto seco mostro gran solubilidad en etanol, metanol y agua en orden decreciente, con solventes de constantes dieléctricas aproximadas de 25, 33 y 80 respectivamente, según se observa en la Tabla 2.

En cuanto a la solubilidad del extracto etanólico de *O.rosea*, Díaz et al., (2011) reportan haber hallado mayor solubilidad con metanol, etanol y medianamente con agua, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que como es sabido, la solubilidad de los compuestos fenólicos depende de la forma en que se encuentren los metabolitos, es decir, si están glicosilados o están en forma de agliconas (sin carbohidrato), del número y clase de sustituyentes presentes en su estructura. Así, los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo (Martínez, 2005). Por otro lado, ya desde el año 2007 (Yarlequé et al.) habían reportado la presencia de actividad anticoagulante en el extracto acuoso de *O.rosea*. Lo cual concuerda con la facilidad que mostró parte del extracto seco en disolverse en agua y de las fracciones obtenidas por cromatografía en Capa Fina. Además, las estructuras químicas sugeridas para las cinco fracciones, son altamente hidroxilados y tres de ellas son glicosiladas, lo que concuerda con la característica química que debe presentar los metabolitos para ser soluble en agua.

Evaluación fitoquímica del extracto alcohólico, fase acuosa y las fracciones de cromatografía de capa fina en celulosa.

La marcha fitoquímica realizada al extracto etanólico de las hojas de *O. rosea* mostró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas y glucósidos, no se detectó la presencia de aminoácidos libres, estos resultados concuerdan con lo reportado con Díaz et al. (2011), que indican haber encontrado reacción positiva para los mismos principios activos fenólicos que nosotros identificamos. Al ser evaluada la fase acuosa obtenida del extracto alcohólico los resultados mostraron la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y glucósidos, no se observó la presencia de saponinas. Por otra parte, al evaluar las nueve fracciones obtenidas mediante cromatografía en capa fina, solamente cinco resultaron positivas a la presencia de fenoles y flavonoides (Tabla 3, Fig.11A y 11B).

TABLA 3. Marcha fitoquímica del extracto alcohólico y la fase acuosa de las hojas de *Oenothera rosea*

Pruebas de Reconocimiento	Reacción	Extracto Etanólico	Fase acuosa
Fenoles	Cloruro Férrico	+	+
Flavonoides	Shinoda	+	+
Taninos	Gelatina	+	+
Saponinas	Afrosimétrico	+	+
Glucósidos	Molish	+	+
Aminoácidos Libres	Ninhidrina	--	--
Reacción positiva: + Reacción negativa: --			

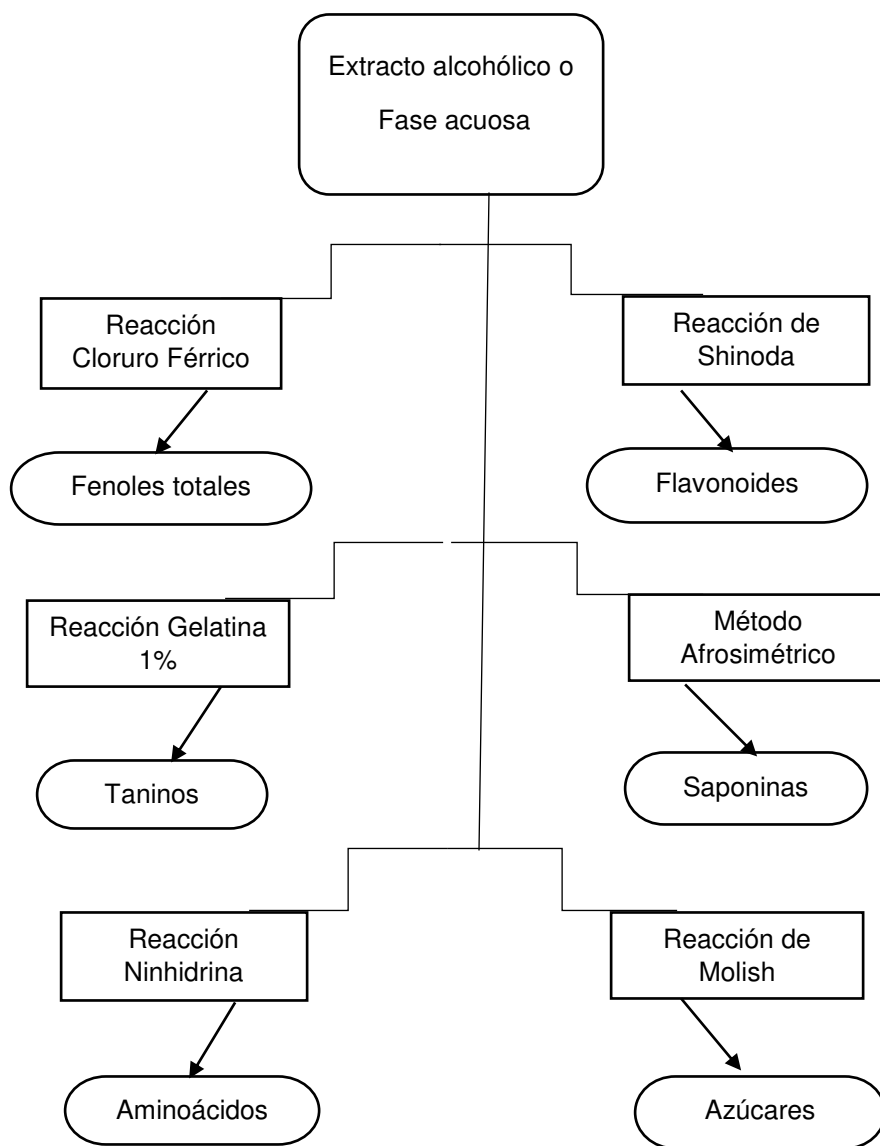


FIGURA 10. Diagrama de la marcha fitoquímica

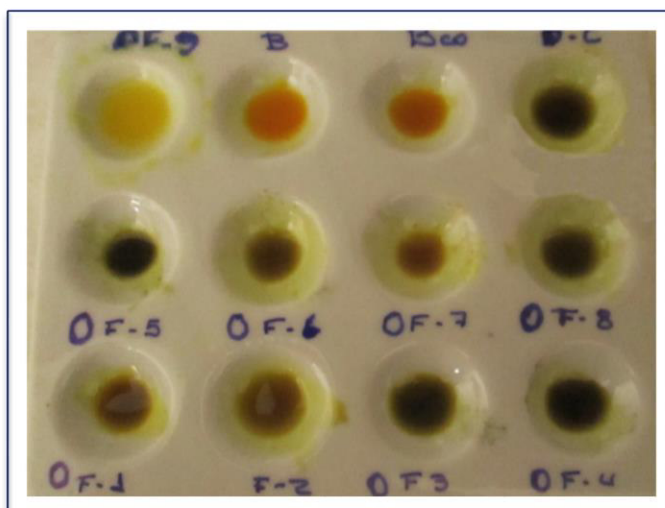


FIGURA 11A. Reacción de cloruro férrico para reconocimiento de fenoles.

B: Blanco OC: Fase acuosa; O F-1: Fracción 1; OF-2: Fracción 2; OF-3:Fracción3;
OF-4: Fracción 4; OF-5: Fracción 5; OF-6: Fracción 6; OF-7: Fracción 7; OF-8: Fracción 8
y OF-9: Fracción 9. Reacción positiva: de verde hasta azul. Reacción negativa: amarillo a
naranja.

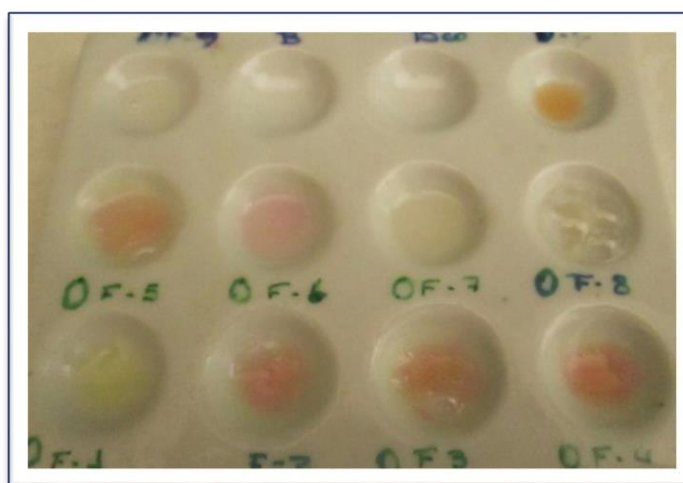


FIGURA 11B. Reacción de Shinoda para reconocimiento de flavonoides.

B: Blanco OC: Fase acuosa; O F-1: Fracción 1; OF-2: Fracción 2; OF-3:Fracción3;
OF-4: Fracción 4; OF-5: Fracción 5; OF-6: Fracción 6; OF-7: Fracción 7; OF-8: Fracción 8
y OF-9: Fracción 9. Reacción positiva: coloración rojiza. Reacción negativa: amarillo hasta
incoloro.

La marcha fitoquímica está compuesta por una serie de métodos de detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos presentes en las plantas, después de ser extraídos sus metabolitos secundarios con solventes como el etanol, metanol y/o agua, etc., o mediante métodos cromatográficos. Las reacciones utilizadas son de color y cualitativas, como la de cloruro férrico que da color azul negruzco ante la presencia de compuestos fenólicos, la prueba de Shinoda que reconoce flavonoides dando coloraciones de rojas hasta violeta, el caso de saponinas se utiliza la capacidad de formar espuma persistente por 30 minutos cuando es agitada en agua, los taninos son reconocidos por la capacidad que tienen para precipitar a las proteínas, los glucósidos con la reacción de Molish y los aminoácidos libres con el reactivo de Ninhidrina (Lock, 1994).

La cromatografía en Capa fina con celulosa en el sistema agua: etanol (5:1) permitió el aislamiento de cinco flavonoides, dos de los cuales presentan actividad anticoagulante sobre plasma humano citratado.

Los reportes de Cuccioloni et al., (2009), Viskupicova et al., (2012), Bijak et al., (2014), indican que los polifenoles presentes en extractos vegetales presentan efecto inhibitorio sobre la coagulación del plasma humano *in vitro* o actúan como inhibidores de las serinoproteasas. Por otra parte, hay reportes que indican haber aislado compuestos responsables del efecto inhibitorio sobre la trombina y la tripsina cuya estructura corresponde a flavonoides. Maliar et al., (2003), señalan que el 5,7 dihidroxi flavonoide, quercetina, miricina y morina son inhibidores de tripsina y de la enzima semejante a tripsina; por su parte, Mozzicafredo et al. (2006), Liu et al. (2010) y Bittencourt et al., (2015), coinciden en señalar que la quercetina es un flavonoide inhibidor de trombina, sin embargo, Bittencourt et al., además indican que las formas glicosiladas de la quercetina presentan una inhibición más estable que el aglicón. El año 2002, Yarlequé et al., aislaron dos flavonoides con actividad anticoagulante sobre el plasma humano citratado: 3', 4', 5,-trihidroxi- 7-O-gli flavanona y 3', 5-dihidroxi 4-O-metil-7-O-Rh-glucosil flavanona y el 2007, ellos también reportaron que el extracto acuoso de *O.rosea* prolonga el tiempo de recalcificación del plasma humano citratado. Toda esta información nos llevó a investigar las fracciones de la

fase acuosa que resulten positivas en las reacciones de reconocimiento de fenoles y flavonoides, y encontramos cinco fracciones con estas características F-2, F-3, F-4, F-5 y F-6, obtenidas de una cromatografía en capa fina sobre celulosa, como se observa en las Figuras 11A y 11B.

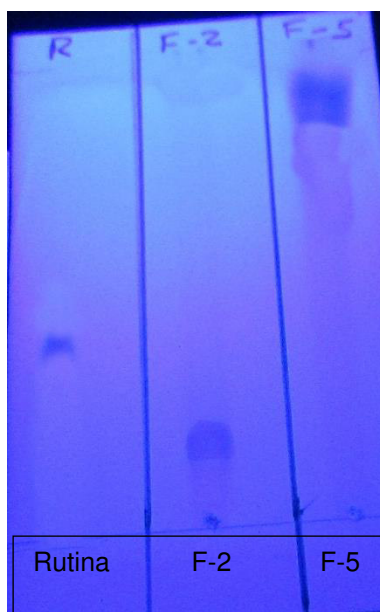


FIGURA 12. Cromatografía en capa fina sobre celulosa revelado con luz UV 366 nm
Sistema 1:5 etanol-agua. R: Rutina. F-2: Fracción 2. F-5: Fracción 5.

2. **Aislamiento flavonoides con efecto anticoagulante y ensayos de reconocimiento.**

La cromatografía en Capa fina con celulosa en el sistema agua: etanol (5:1) permitió el aislamiento de cinco flavonoides, dos de los cuales presentaron actividad anticoagulante sobre plasma humano citratado por lo que fueron sometidas a pruebas relacionadas con esta actividad. A las dos fracciones que contienen actividad anticoagulante se le realizó otra cromatografía con las mismas condiciones para compararlas con el estándar Rutina, como se observa en la Figura 12.

Se eligió el sistema 5:1, debido a que las fracciones respondían positivamente con la reacción de Molish (reacción general para carbohidratos), lo que indicó que las moléculas eran glicósidos, por tanto se debía utilizar una fase móvil de una polaridad más baja que la del agua ya que los flavonoides glicosilados así lo requieren para su separación (Yarlequé et al., 2002). Como se observa en la Figura 12, el sistema 1:5 etanol: agua, permitió separar las fracciones y probablemente se encuentran bastante puras, resultando el coeficiente de retardo (R_f) de 0,18 para F-2 y 0,9 para F-5. El R_f para el estándar (Rutina) fue de 0,36. La Rutina, es un flavonol glucosilado en la posición 3 con ramnoglucosil (ramnosa y glucosa) lo que indica que se trata de un compuesto muy polar dado por los OH libres del flavonoide y los OH de los carbohidratos que son sustituyentes, sin embargo, la F-2 es más polar probablemente por que está doblemente glucosilado en la posición 3 y 7 y por ello tiene un R_f más pequeño, mientras que F-5 presenta posiblemente un solo carbohidrato en la posición 7 y además carece del OH libre en la posición 3, lo que lo hace menos polar por tanto se separa bien de la F-2, es importante indicar que las flavonas son menos polares por carecer del 3 OH que los flavonoles lo poseen.

La fase acuosa de *O.rosea* así como dos fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina (CCF) sobre celulosa, mostraron actividad inhibitoria sobre las enzimas coagulantes como la trombina bovina y el veneno crudo de *L.muta* que contiene enzima semejante a trombina según reporto Yarlequé A (1987). El efecto sobre la trombina en la coagulación del fibrinógeno bovino, se observó, que la

fase acuosa (F-A) presentó 95,74 % de inhibición, mientras que las fracciones F-2: 58,57% y F-5: 96,79%. Sin embargo hay que destacar que la concentración de los flavonoides puros fue de 0,24 mg/ml mientras que la fase acuosa de 60 mg/ml, lo que indica que la F-5 es más potente que la F-A, Tabla 4.

TABLA 4. Efecto de la fase acuosa y las fracciones 2 y 5 sobre la actividad coagulante de la trombina bovina.

Muestra	Concentración Flavonoide mg/ml de Rutina	* Actividad Enzimática (AE) x10-3	% de AE Coagulante	%de inhibición de la coagulación
Control: Trombina 0,02 mg/ml	---	1 724 \pm 0,6	100	-----
Fase acuosa + trombina	60	73,52 \pm 0,4	4,26	95,74
F-2 + trombina	0,24	714,28 \pm 0,5	41,43	58,57
F-5+ trombina	0,24	55,5 \pm 0,6	3,21	96,79

*Promedio \pm SD, n=3

F-2: Fracción - 2 acuosa. F-5: Fracción- 5 acuosa

Estándar de flavonoide: Rutina

Enzima: Trombina (1Unidad) =0,020mg/ml. Sustrato: Fibrinógeno bovino.

En cuanto al efecto sobre tiempo de coagulación del veneno de serpiente *L.muta*, utilizando como sustrato fibrinógeno bovino, se encontró el %de inhibición de la F-A un valor de 90,08 mientras que las fracciones F-2 y F-5 por su parte inhiben 10,67% y 36,27 % respectivamente (Tabla 5), estos resultados señalan a

F-5 como el flavonoide con mayor potencia inhibidora sobre el veneno de serpiente *L.muta* que F2, ambos con 0,24 mg/ml de concentración.

TABLA 5. Efecto de la fase acuosa y las fracciones 2 y 5 sobre la actividad coagulante del veneno de *L.muta*

Muestra	Concentración de Flavonoide (mg/ml Rutina)	*Actividad Enzimática (AE) x10-3	% de AE Coagulante	% de inhibición de la coagulación
Control: L muta 0.036 mg/ ml	----	193±0,7	100	---
Fase acuosa + <i>L. muta</i>	60	19.15±0,8	9.92	90,08
F-2 + <i>L. muta</i>	0,24	172.41±0,7	89.33	10,67
F-5 + <i>L. muta</i>	0,24	123±0,6	63.73	36,27

*Promedio± SD, n=3

F-2: Fracción - 2 acuosa. F-5: Fracción- 5 acuosa.

Estándar de flavonoide: Rutina.

Sustrato: Fibrinógeno bovina.

Concentración de veneno: 1mg/ml de veneno de *L.muta* leído a 280 nm es 1,62 mg/ml

Cuando se evaluó el veneno de serpiente *L.muta* y se utilizó como sustrato plasma humano citratado, se encontró que la fase acuosa (F-A) de *O.rosea* mostró %inhibición de 63,58; mientras que la F-2 34,14 y F-5 70,69 (Tabla 6), estos resultados reflejan que la potencia anticoagulante más alta la presenta F-5 con más de tres veces que la F-2.

TABLA 6. Efecto de la fase acuosa y las fracciones 2 y 5 sobre la coagulación del plasma humano por el veneno de *L. muta*

Muestra	Concentración Flavonoide (mg/ml Rutina)	Actividad Enzimática (AE) x10-3	% de AE Coagulante	% de inhibición de la coagulación
Control: L.muta 0.036 mg/ ml	-----	76,97±0,9	100	---
Fase acuosa + <i>L .muta</i>	60	28,04±0,7	36,42	92,65
F-2 + <i>L.muta</i>	0,24	50,70±0,7	65,86	88,59
F-5 + <i>L.muta</i>	0,24	22,56±0,6	29,31	92,92

*Promedio± SD, n=3

F-2: Fracción - 2 acuosa. F-5: Fracción- 5 acuosa

Estándar de flavonoide: Rutina

Sustrato: Plasma fresco humano citratado

Concentración de veneno: 1mg/ml de veneno de *L.muta* leído a 280 nm es 1,62 mg/ml de proteína (Yarlequé et al., 2012)

La Actividad amidolítica del veneno de serpiente *L. muta* sobre el BApNA fue también afectada por la presencia de flavonoides en las muestras hallándose para la fase acuosa un % de inhibición de 92,65 y las fracciones por su parte mostraron valores cercanos de inhibición, F-2: 88,59 y F-5 cercano a 99% (Tabla 7), los que muestran mayor inhibición que con los otros sustratos, siendo el BApNA sustrato específico para las serinoproteasas.

TABLA 7. Efecto de la fase acuosa y las fracciones 2 y 5 sobre la actividad amidolítica del veneno crudo de *L. muta*

Muestra	Concentración Flavonoide (mg /ml de Rutina)	*Actividad Específica Amidolítica (AEA) (U/mg de proteína) X10-3	% de inhibición de la AEA
L muta 0.5 mg/ml	-----	22.91±0,7	0
Fase acuosa + <i>L.muta</i>	60	7,35±0,5	92,65
F-2 + <i>L. muta</i>	0,24	11,41±0,4	88,59
F-5 + <i>L. muta</i>	0,24	7,08±0,5	92,92

*Promedio± SD, n=3

F-2: Fracción - 2 acuosa. F-5: Fracción- 5 acuosa.

Estándar de flavonoide: Rutina

Concentración de veneno: 1mg/ml de veneno de *L.muta* leído a 280 nm es 1,62 mg/ml de proteína (Yarlequé et al., 2012)

Siendo la trombina y la enzima semejante a trombina del veneno de serpiente de *L.muta*, serinoproteasas responsables de la coagulación sanguínea, estas se caracterizan bioquímicamente por presentar el centro activo con tres aminoácidos que participan activamente en la catálisis sobre su sustrato, estos son: Ser 95, Asp 102 e His 57, el mecanismo es el siguiente en una primera fase ocurre la acilación en el que se forma un intermediario covalente acil-enzima, con liberación del primer producto y una fase de desacilación en que la molécula de agua rompe el intermediario con la liberación del segundo producto (Figura 13A). La trombina es

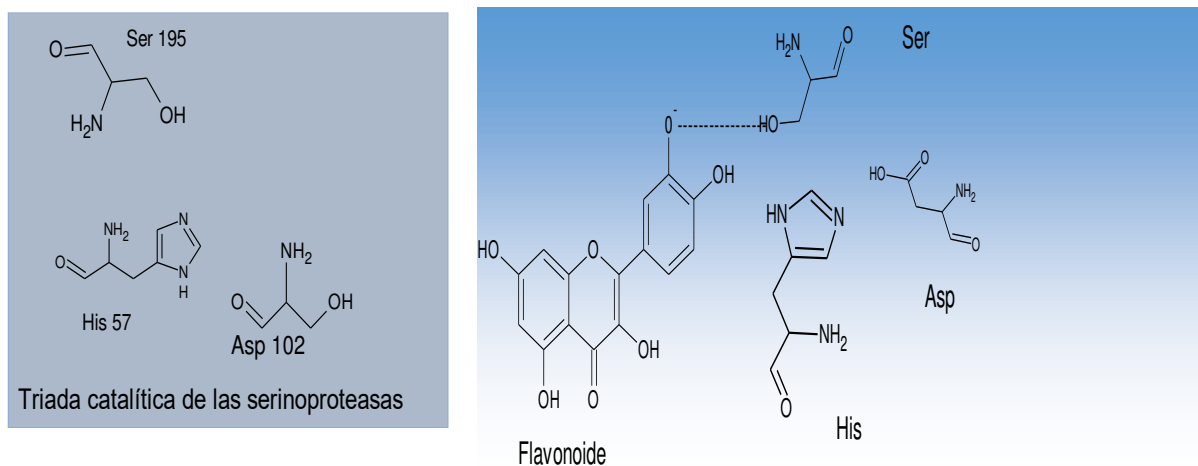
una glicoproteína formada por dos cadenas de polipéptidicas de 36 y 259 aminoácidos respectivamente unidas por un puente disulfuro. Una vez activada, la molécula tiene una forma más o menos esférica en la que se han identificado tres puntos importantes: (a) el sitio catalítico que confiere a la molécula su propiedad de serina proteasa, donde se fija el sustrato (el fibrinógeno), también llamado receptor de trombina y (b) dos sitios para la fijación de la antitrombina III inactivando a la trombina cargados positivamente llamados exosito 1 y exosito 2.

Los resultados hallados sobre el tiempo de coagulación son semejantes a los publicados por Jedinák et al.,2006, que indican haber encontrado efecto inhibitorio sobre la trombina por parte de silibina presente en las hojas de *Prunus salicina*; por otra parte Mozzicafreddo et al.,2006, encontraron el efecto inhibitorio de un grupo de flavonoides sobre la actividad amidolítica de la trombina humana e indicaron que entre los flavonoides evaluados estaba la quercetina, y que éstos actuaron como inhibidores reversibles, siendo el complejo de quercetina -trombina más estable a pH = 7,5. El análisis de acoplamiento químico indica que la quercetina es un buen inhibidor debido a que presenta una estructura plana y de bajo impedimento estérico, y a su capacidad donar un H⁺ a la His57 del centro activo de la trombina. Por ser la quercetina un flavonol cuya estructura es muy semejante a la F-2, siendo la diferencia que el flavonol aislado es glicosilado a nivel de la del carbono 3 y 7, probablemente por monosacáridos, los resultados hallados indican que el mecanismo de inhibición de los flavonoides anticoagulantes sería muy parecidos al propuesto por los investigadores antes mencionados. Por otra parte, es importante indicar que la F-5 es una flavona glicosilada y capaz de inhibir la actividad amidolítica de la trombina y el veneno de serpiente *L.muta* como ya se observa en la Tabla Nro.7, y lo hace con mayor potencia que la F-2 (flavonol diglicosilado). Una investigación parecida a la presente, es la de Bittencourt et al. (2015) los que evaluaron la actividad inhibitoria de flavonoides sobre la acción de la trombina utilizando plasma humano y un sustrato cromogénico (beta-Ala-Gly-Arg para-nitroanilida). Este es hidrolizado por la trombina para producir beta-Ala-Gly-Arg y p-nitroanilina; pero ellos en su análisis en cromatografía líquida con espectro de masas encontraron que el quercetina y la trombina forman un complejo y que esta

unión parece ser inestable en comparación con las formadas entre la Trombina-Quercetina rhamnosil (TH- Qn) o Trombina-Quercetina arabinosa (TH- Qara). Sus resultados son nuevos debido a que algunos estudios habían informado que la quercetina y la morina (agliconas), eran potentes inhibidores de la trombina lo que es contrario a lo señalado por Bittencourt et al., quienes encontraron que Qn y Qa son mejores inhibidores de la trombina que la quercetina (aglicona) obtenidos de *L. racemosa* e indican que el azúcar juega un rol importante en la inhibición. Bijak et al. (2014), señalan quercetina y silibina bloquean el centro activo del Factor Xa a nivel de la Ser 195, disminuyendo la actividad amidolítica. Jedinák et al., 2006, por su parte, indicaron que la salibina actuaba sobre la trombina inhibiendo su acción.

Por todo lo expuesto, debe considerarse las relaciones estructura-actividad ya que podrían proporcionar información para facilitar el aislamiento y utilización de los flavonoides como inhibidores de la trombina en el tratamiento de enfermedades tromboticas. Además, nuestros resultados muestran que los flavonoides inhibidores de la coagulación son glicósidos y, concuerda con los reportes más recientes, donde se indica que la presencia de carbohidrato en la molécula los hace mejores inhibidores de la trombina, sin embargo, se debe tener en cuenta el tipo de azúcar ya que por lo visto los monosacáridos juegan un rol importante en el efecto que presentan los flavonoides. Una de las fracciones evaluadas, fue la rutina aislada de *O. rosea*, siendo glicosilada no presentó actividad anticoagulante, probablemente porque el C3 está sustituido por dos unidades de carbohidrato (rhamnoglucosil) y no uno como lo reportado para la quercetina-rhamnosa y quercetina-arabinosa. Pero, para las F-2 y F-5 proponemos estructuras glicosiladas por monosacáridos en dos posiciones para la primera 3,7 flavonol y 7 flavona para la segunda respectivamente, lo que las haría como potentes inhibidores de trombina. Sin embargo, F-5 mostró mayor poder inhibidor que F-2, sin poseer glicósido en el carbono 3; estos resultados nos indican que es de suma importancia la presencia de grupos OH en el anillo B de los flavonoides, los cuales son muy ácidos y fácilmente podrían ser donados a la His del centro activo, lo que permitiría unirse a través de enlace de hidrógeno a la Ser con el flavonoide formando un complejo cuya estabilidad depende de la presencia de

azúcares que formarían enlaces con los grupo R de aminoácidos cercanos al centro activo, Figura 13B.



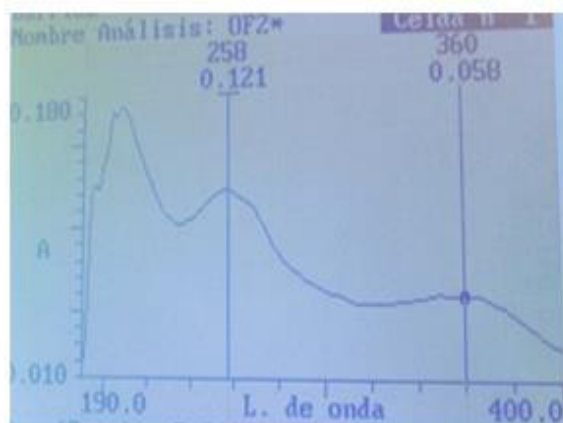
A

FIGURA 13A. Centro activo de serinoproteasas

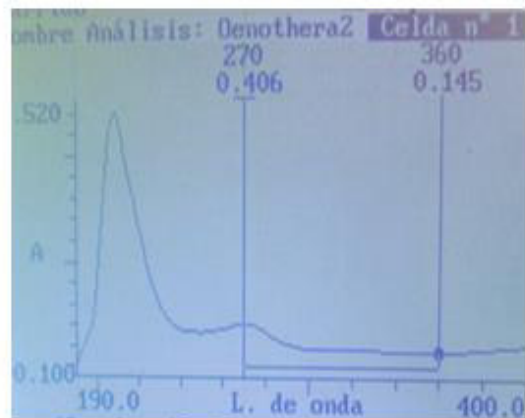
B

FIGURA 13 B. Complejo Enzima-Flavonoide

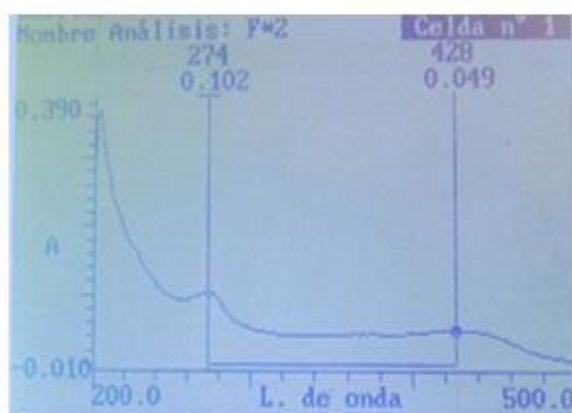
Después de haber obtenido los espectros UV-Vis y las reacciones de desplazamiento y por comparación con los espectros publicados por Mabry et al.(1970),se sugiere las estructuras de los siguientes flavonoides : **F-2:** 3',4',5, trihidroxi-3,7-O-diGli flavonol (Figura 14, 15); **F-3:** 3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-rhamnoglicosil flavonol (rutina) (Figura 16, 17); **F-4:** 3',4',5,7-tetrahidroxi-3-metóxido flavonol,(Figura 18, 19); **F-5 :** 3',4',-dihidroxi,7-O-gli,5 metóxido flavona (Figura 20, 21) y **F-6:** 5,6,7-trihidroxi flavona (Baicaleina, Figura 22-23).



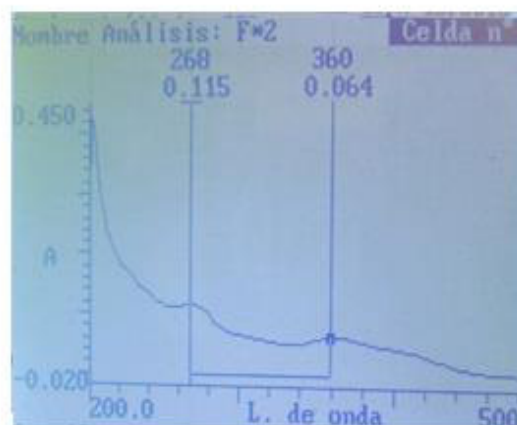
A: F-2 en Metanol



B: F-2 en Metanol + Metóxido de Sodio

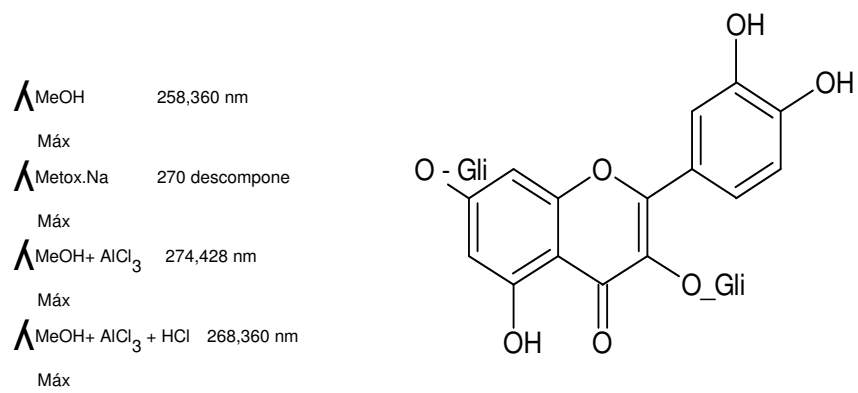


C: F-2 en Metanol+AlCl₃



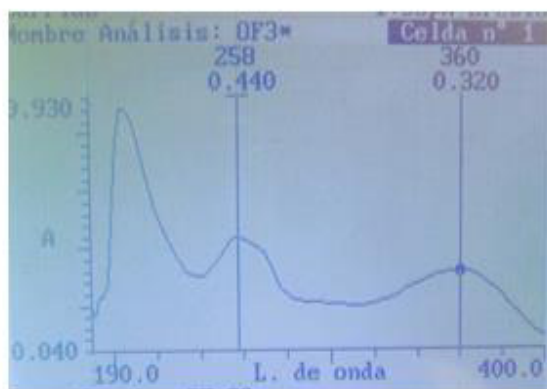
D: F-2 en Metanol+ AlCl₃ + HCl

FIGURA14. Espectros UV-VIS con reactivos de desplazamiento de la F-2

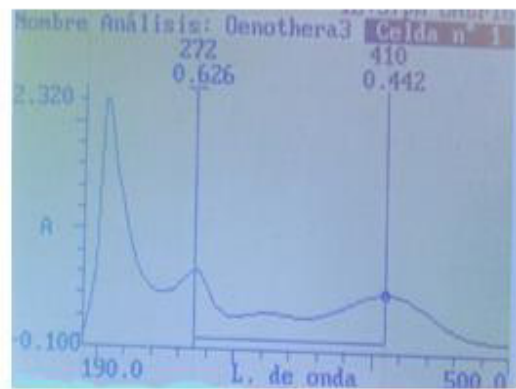


3',4',5 - trihidroxi-3,7-O-digli flavonol

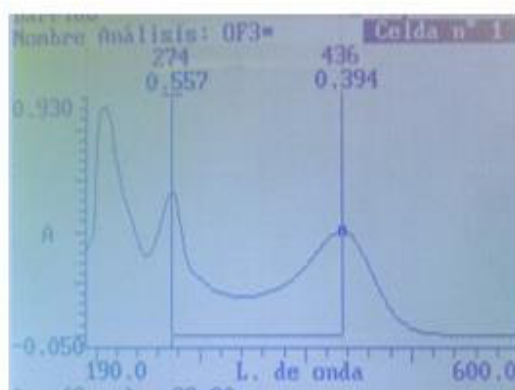
FIGURA 15. Estructura química propuesta para F-2



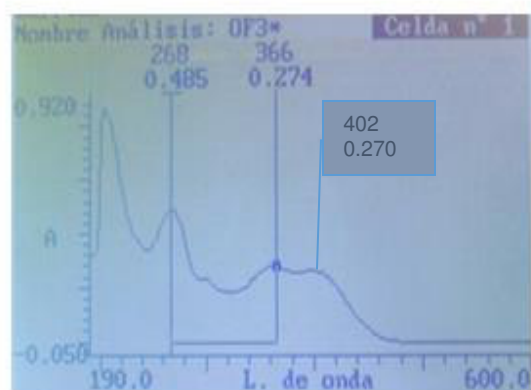
A: F-3 en Metanol



B: F-3 en Metanol + Metóxido de Sodio



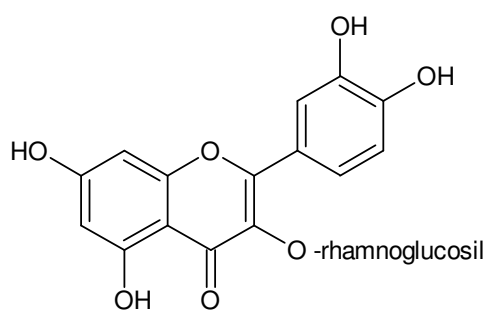
C: F-3 en Metanol+AlCl₃



D: F-3 en Metanol+ AlCl₃ + HCl

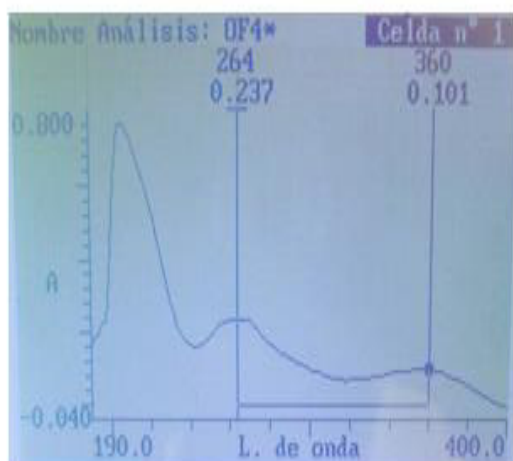
FIGURA 16. Espectros UV-VIS con reactivos de desplazamiento de la F-3.

Λ MeOH	258,360 nm
Máx	
Λ Metox. Na	272,410 nm
Máx	
Λ MeOH+ AlCl ₃	274,436 nm
Máx	
Λ MeOH+ AlCl ₃ + HCl	266,402 nm
Máx	

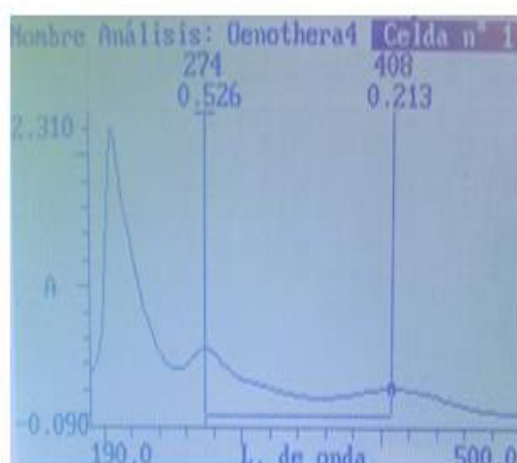


3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-rhamnoglucosil
flavonol (RUTINA)

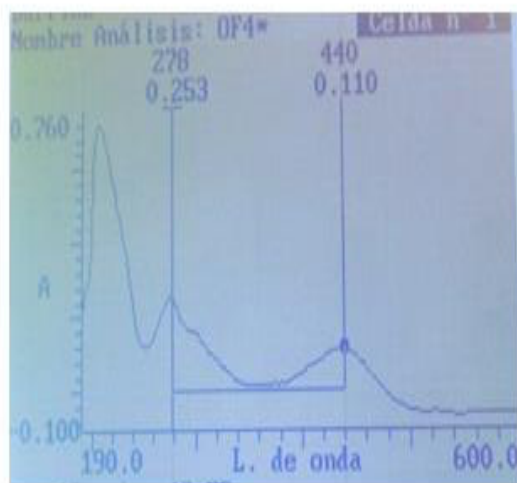
FIGURA 17. Estructura química propuesta para F-3



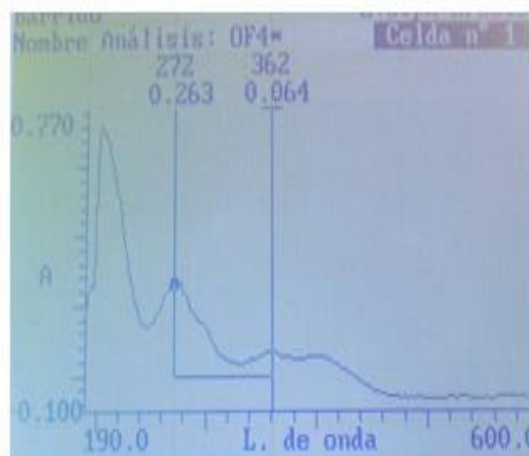
A: F-4 en Metanol



B: F-4 en Metanol+ Metóxido de Sodio



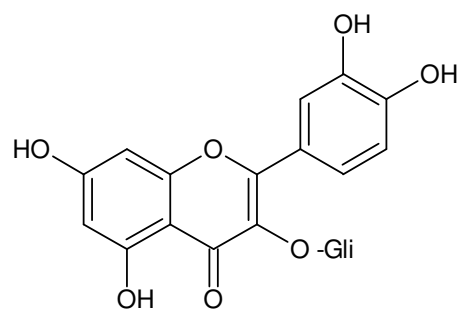
C: F-4 en Metanol+AlCl₃



C: F-4 en Metanol+AlCl₃+ HCl

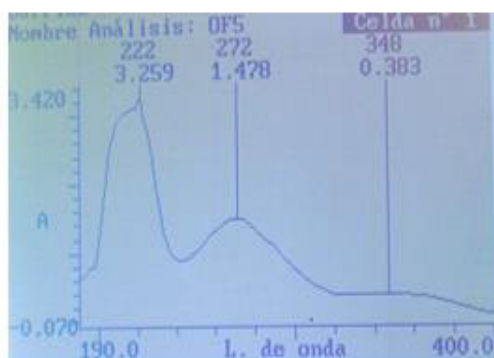
FIGURA 18. Espectros UV-VIS con reactivos de desplazamiento de la F-4

λ_{MeOH}	264,360 nm
Máx	
$\lambda_{\text{Metox.Na}}$	274,408 nm
Máx	
$\lambda_{\text{MeOH+ AlCl}_3}$	278,440 nm
Máx	
$\lambda_{\text{MeOH+ AlCl}_3 + \text{HCl}}$	272,362 nm
Máx	

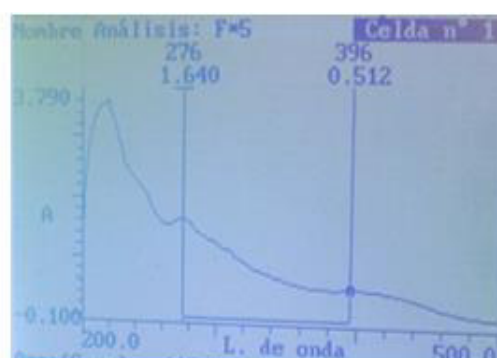


3',4',5,7- tetrahidroxi- 3 - O- Gli flavonol

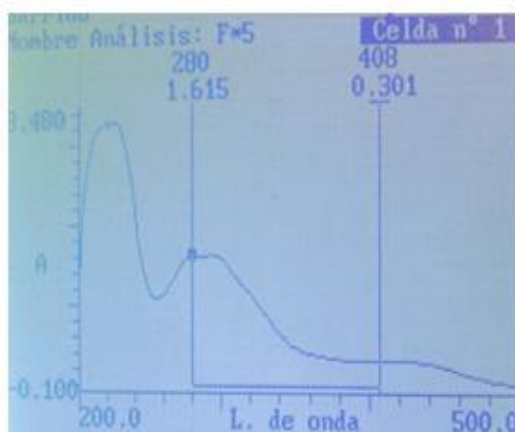
FIGURA 19. Estructura química propuesta para F-4



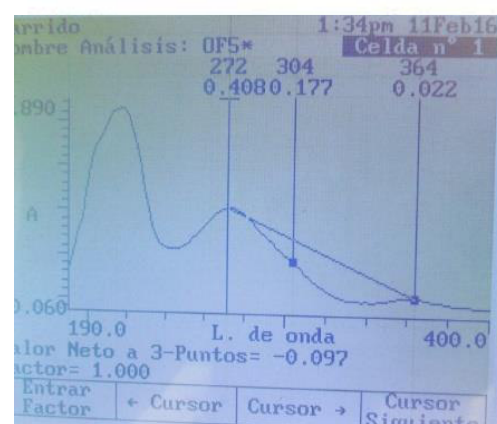
A: F-5 en Metanol



B: F-5 en Metanol + Metóxido de Sodio



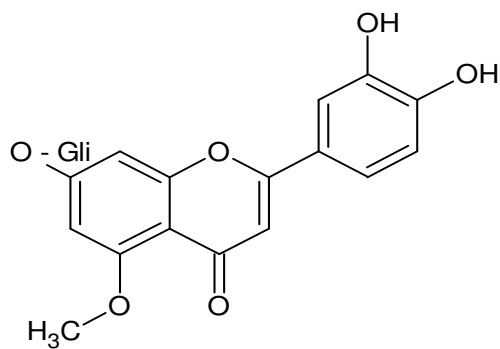
C: F-5 en Metanol + AlCl_3



C: F-5 en Metanol + AlCl_3 + HCl

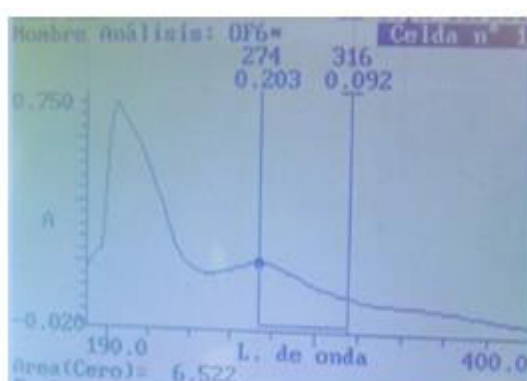
FIGURA 20. Espectros UV-VIS con reactivos de desplazamiento de la F-5

Λ_{MeOH}	272,348 nm
Máx	
$\Lambda_{\text{Metox.Na}}$	276,396 nm
Máx	
$\Lambda_{\text{MeOH+ AlCl}_3}$	280,408 nm
Máx	
$\Lambda_{\text{MeOH+ AlCl}_3 + \text{HCl}}$	272,364 nm
Máx	

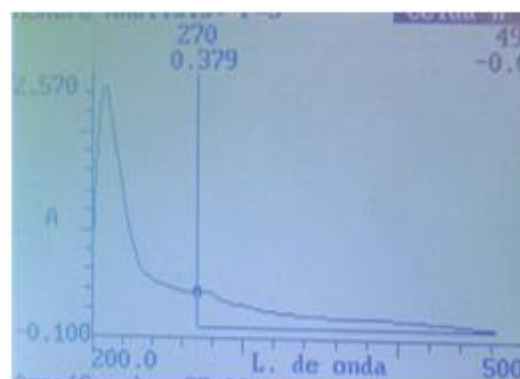


3',4'- dihidroxi-7- O- Gli-5-metóxido flavona

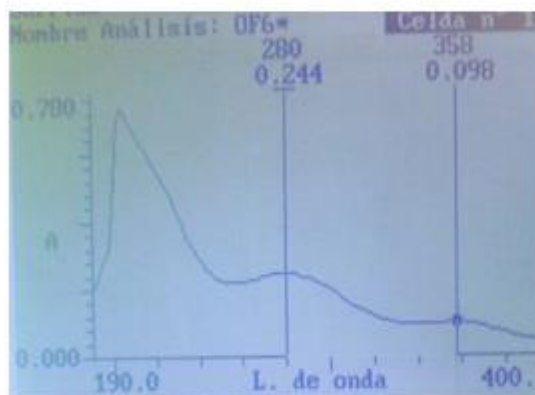
FIGURA 21. Estructura química propuesta para F-5



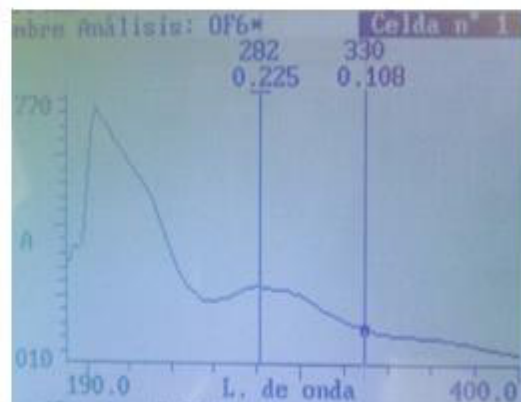
A: F6 en Metanol



B: F6 en Metanol + Metóxido de sodio



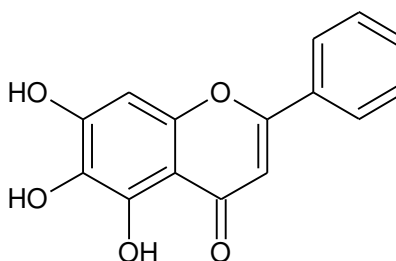
C: F6 en Metanol + AlCl_3



D: F6 en Metanol + AlCl_3 + HCl

FIGURA 22. Espectros UV-VIS con reactivos de desplazamiento de la F-6

λ_{MeOH} 274,316 nm
 Máx
 $\lambda_{\text{Metox.Na}}$ 270 nm, descomposición
 Máx
 $\lambda_{\text{MeOH+ AlCl}_3}$ 280,358 nm
 Máx
 $\lambda_{\text{MeOH+ AlCl}_3 + \text{HCl}}$ 282,330 nm
 Máx



5,6,7-trihidroxi flavona (BAICALEINA)

Figura 23: Estructura química propuesta para F-6

La espectroscopia de absorción ultravioleta visible es ampliamente usada para la determinación de las estructuras tipo flavonoides, por lo que constituye una herramienta muy útil en la elucidación estructural de estos metabolitos, pues se registran bandas características para cada tipo de flavonoide. Los espectros UV de los flavonoides obtenidos principalmente en metanol presentan bandas

características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. El rango general de lectura se localiza a longitudes de onda entre 240-285 nm (BII) y de 300-500 nm (BI). Para la identificación de las estructuras propuestas se utilizaron los espectros publicados por Mabry et al. (1970). Lock señala, que estos espectros UV-Vis y las reacciones de desplazamiento son muy útiles sobre todo para el estudio de flavonoides, aproximadamente desde 1990 muchos investigadores peruanos están utilizando esta metodología para proponer estructuras de fenoles aislados (Bonilla P, 1996; Ruitón et al.1998; Yarlequé et al., 2002; Gil et al.2008; Aguilar et al., 2009). El uso de reactivos de desplazamiento tiene la capacidad de poder identificar los hidroxilos presentes en la molécula de flavonoides, cuando se utilizan metóxido de sodio, cloruro de aluminio, y cloruro de aluminio con ácido clorhídrico. Estos desplazamientos muestran espectros que indican en que posiciones de la molécula se encuentran las sustituciones. En el caso de F-2, las lecturas obtenidas con los reactivos de desplazamiento antes mencionados, encontramos que el anillo A (Banda II) al tratarlo con Cloruro de Aluminio hay un ligero efecto batocrómico de 16 nm, lo que indica que en la posición C5 hay OH libre, para que se forme el complejo con el aluminio que es hidrolizado con el ácido clorhídrico. En cuanto al anillo B su OH del C3 está sustituido por un glicósido y su lectura en metanol está en el rango de 330 a 360, lo que indica que se trata de un flavonol. Por otra parte, 3' y 4' dihidroxilado forma un complejo con el cloruro de aluminio que se manifiesta en un efecto batocrómico de la Banda I (BI) de 68 nm, al agregar el ácido clorhídrico se hidroliza regresando desde 428 a 360 nm lo que confirma que en 3' y 4' hay OH libres, y para la BII un desplazamiento de 16nm, estos resultados concuerdan con lo reportado por Mabry et al.(1970),Harborne (1984), Lock (1994), que señalan que un desplazamiento batocrómico de 6-17 nm en la banda II, indica de la presencia de una flavona o flavonol 5-OH y con el metóxido de sodio, también en BII hay un desplazamiento de 12 nm y en la BI se observa descomposición que generalmente ocurre cuando hay OH libre orto en las posiciones 3' y 4'. Por lo que la estructura que proponemos para F-2: 3',4',5, trihidroxi-3,7-O-digli flavonol (Fig. 14,15; Tabla 7).

Con referencia a la F-5, en metanol hallamos picos de 272 y 348 nm que al ser tratado con cloruro de aluminio la BII mostró un ligero efecto batocrómico de 4

nm, que indica que la posición C5 el OH no está libre, para que se forme el complejo con el aluminio. En cuanto al anillo B su C3 está sustituido por una metilación y su lectura en metanol está en el rango de 310 a 350, lo que indica que se trata de una flavona. Por otra parte, 3' y 4' dihidroxilado forma un complejo con el cloruro de aluminio que se manifiesta en un efecto batocromico de la Banda I (BI) de 60 nm, al agregar el ácido clorhídrico se hidroliza regresando desde 408 a 364 nm valor cercano al inicial lo que confirma que en 3' y 4' hay OH libres. En cuanto a la BII (anillo A) se observa muy ligero el desplazamiento de 4 nm para el metóxido de sodio y 8 nm para el cloruro de aluminio y cero para el cloruro de aluminio más ácido clorhídrico, estos resultados concuerdan con lo reportado por Mabry et al.(1970), ya que publican para la Luteolina 7-O-rutinosido (flavona) espectros semejantes a los encontrados para la F-5 por lo que sugerimos la siguientes estructura: F-5 : 3',4',-dihidroxi,7-O-gli,5 metóxido flavona (Tabla 7, Fig. 20, 21).

Tabla 7. Desplazamientos Batocrómicos de las Fracciones 2 y 5

Reactivos de Desplazamiento	Fracción -2 (nm)		Fracción – 5 (nm)	
	BII	BI	BII	BI
Metóxido de sodio	12	D*	4	48
Cloruro de Aluminio	16	68	8	60
Cloruro de aluminio y Ácido clorhídrico	10	0	0	16
D* : descomposición				

En cuanto a la F-3, como se ha propuesto es un flavonol con dos unidades de azúcar en la posición 3 ramnosa y glucosa (rutina) , y no muestra actividad anticoagulante porque al parecer no hay un acoplamiento estérico con el centro activo de la enzima, como lo señalaron Bittencourt et al. (2015), para la quercetina-

O-Arabinosa y para la quercetina-O-ramnosa. Hanasaki, et al. reportaron (1994), la acción de la rutina y de otros flavonoides como la (+) catequina, la (-) epicatequina, la 7,8-dihidroxiavona como secuestradores de OH^\bullet generados en un sistema Fenton en un rango de 100 a 300 veces superior a los efectos del manitol, un típico secuestrador de ERO, (Fig.16 ,17).

F-4, flavonol que tampoco muestra acción anticoagulante sobre ninguno de los sustratos evaluados, al parecer tendría una estructura química semejante a la rutina por lo que debe presentar, al igual que ésta un impedimento estérico, Figura. 18,19. Por otro lado, la F-6 que correspondería a la Baicaleína, flavona que fue reportado como agente antiinflamatorio *in vivo* por Chou, (2003), inhibiendo la liberación de mediadores de la inflamación. Por su parte, Ohtsuki, (2009), señala que el extracto de metanólico de células cultivadas *Scutellaria baicalensis* inhibe la proliferación de células de leucemia monocítica de líneas humanas y las células de sarcoma osteogénico humano, indicando a la Baicaleína y sus derivados como responsables de dichos efectos, (Fig. 22, 23).

VIII. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto alcohólico de las hojas de *O.rosea* son principalmente polares y de mediana polaridad.
2. En la marcha fitoquímica del extracto alcohólico y Fase acuosa se detectó la presencia de fenoles, flavonoides, taninos, saponinas y azúcares.
3. Con la cromatografía de capa fina en celulosa se ha logrado aislar cinco Flavonoides: **F-2:** 3',4',5, trihidroxi-3,7-O-diGli flavonol; **F-3:** 3',4', 5,7-tetrahidroxi-3-O-rhamno-glucosil flavonol (rutina); **F-4:** 3',4', 5,7-tetrahidroxi-3-metóxido flavonol; **F-5 :** 3',4',-dihidroxi,7-O-gli,5 metóxido flavona y **F-6:** 5,6,7-trihidroxi flavona (Baicaleina)
4. Dos flavonoides mostraron efecto anticoagulantes el F-2: 3',4',5, trihidroxi-3,7-O-digli flavonol y F-5: 3',4',-dihidroxi-7-O-gli-5- metóxido flavona, siendo el más potente el F-5.
5. Los flavonoides aislados inhiben a las enzimas coagulantes a nivel del centro activo impidiendo que la serina forme el complejo acil-enzima.

IX. RECOMENDACIONES

Estudiar la cinética enzimática de trombina y otras serinoproteasas con las fracciones anticoagulantes de *Oenothera rosea*.

Determinar la IC₅₀ de cada uno de los flavonoides aislados.

Utilizar otros tipos de cromatografía con la finalidad de obtener más cantidad de flavonoides.

Estudiar el mecanismo de acción de los flavonoides responsables de la acción anticoagulante.

Evaluar otras plantas medicinales o vegetales en general para buscar moléculas que inhiban las proteínas coagulantes.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar P. Manual de terapéutica de medicina interna. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2008:27-9

Aguilar, E., Bonilla, P. (2009). Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón). *Ciencia e Investigación*, 12(1), 15-23.

Amzad M., Dawood M.A (2015). Study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extract of endemic plant *Merrenia bornensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 66–71

Alagón Cano Alejandro, 2001. Desmoteplase Y Tromboembolismo: Una Historia Verdadera De Vampiros .XI Congreso Nacional De Biotecnología Y Bioingeniería. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Andersen, O. M., Markham, K. R. (Eds.). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press. 2005.

Domínguez, J. *Metodos de Investigación Fitoquímica*. México: Ed. Limusa. 1973. 81-7.

Furie, B., Furie, B. C. (1990). Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood*, 75(9), 1753-1762.

Loeliger, E. A., Poller, L., Samama, M., Thomson, J. M., Van den Besselaar, A. M., Vermeylen, J., Verstraete, M. (1985). Questions and answers on prothrombin time standardisation in oral anticoagulant control. *Thrombosis and haemostasis*, 54(2), 515-517.

Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Francis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., Sinclair, A. J. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa

(Theobroma cacao) inhibit platelet function. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1466-1473.

Nemerson, Y. (1988). Tissue factor and hemostasis. *Blood*, 71(1), 1-8.

Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278.

Al-Fayez, M., Cai, H., Tunstall, R., Steward, W., Gescher, A. (2006). Modulación diferencial de la producción de prostaglandina ciclooxygenasa mediada por los flavonoides chemopreventive supuesto cáncer apigenina y la quercetina. *Cáncer Chemother Pharmacol*; 58,816-25.

Ansell, J., Hirsh, J., Hylek, E., Jacobson, A., Crowther, M., Palareti, G. Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists. *Chest* 2008; 133, 160-198.

Banerjee, T., Van der Vliet, A., Ziboh, V., (2002). Abajo la regulación de COX-2 e iNOS amentoflavone y quercetina en línea de células de adenocarcinoma de pulmón humano A549. *Prostag Leukotr Essent ácidos grasos*; 66,485-492.

Beltrán Delgado, Yaixa, Morris Quevedo, Humberto J, de la Cruz, Enrique Reynaldo, Quevedo Morales, Yanelis, & Bermúdez Savón, Rosa Catalina. (2013). Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(2), 121-129. Recuperado en 27 de junio de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000200001&lng=es&tlng=es.

Berrin, J., McLauchlan, W., Needs, P., Williamson, G. (2002). Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *Eur J Biochem*, 269(5); 249-258.

Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podsędek, A., Golański, J., Nowak, P. (2011). Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*, 82(6), 811-817.

Bijak M, Ziewieck i Saluk J, Ponczek M, Pawlaczyk I, Krotkiewski H, Wachowicz B., Nowak, P. (2014). Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Medicinal Chemistry Research.*, 23 (5) 2324–337.

Bittencourt C, Hessel H, Novo M, Pena M, Ferreira M, Terashima M, de Oliveira D, Hikari M. (2015). Evaluation of Potential Thrombin Inhibitors from the White Mangrove L. (*Laguncularia racemosa*). *Mar. Drugs*, 13, 4505-519

Bonilla, P. (1996). Estudio Fitoquímico de la especie silvestre *Lupinus ballianus*. Tesis para optar de grado de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos UNMSM. Lima Perú.

Caballero Oliva, Eduardo, del Valle Llagostera, Juan Guillermo, & Pascual Simón, José Ramón. (2011). Thrombolysis impact on patients with acute myocardial infarction in Primary Health Care. *MEDISAN*, 15(6), 813-819. Recuperado en 29 de junio de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192011000600012&lng=es&tlng=en.

Boucher, B. A., Traub, O. (2009). Achieving hemostasis in the surgical field. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 29(7P2), 2S-7S.

Campbell HA, Link KP. (1941). Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. IV: The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. *J Biol Chem*; 138(4) 21-33.

Carrillo, R., de la Torre, T., Rosales, A. (2013). Complejo trombomodulina, proteína C, receptor endotelial de proteína C en sepsis. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 56(5), 14-25.

Céspedes, S., Flores, M. Etnobotánica de Plantas Medicinales de las Comunidades Campesinas de Quero y Masma Chicche. En: Las plantas Medicinales del Perú. Madrid. Los Libros de la Catarata, 2010: 37.

Chou, T. C. (2003). Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *British journal of pharmacology*, 139(6), 1146-1152.

- Concha Benavente, F. (2010). Efecto in vitro del látex de *Ficus insipida* sobre la cascada de la coagulación sanguínea. *Revista Médica Herediana*, 21 (3), 15-20
- Copley, A. (1973) Studies of snake venom on the blood coagulation. I. The Thromboserpentin enzyme in venoms. *Thrombos. Res.* 1 (2):487-508.
- Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Sparapani, L., Spina, M., Eleuteri, A. M., Fioretti, E., Angeletti, M. (2009). Pomegranate fruit components modulate human thrombin. *Fitoterapia*, 80(5), 301-305.
- Cuéllar, M. J., Roma, E., Planells, C., Carmona, P. M. (2000). Hirudinas: Nuevas Perspectivas En Terapia Antitrombótica. *Farm Hosp*, 24(4), 179-186.
- Davie EW, Ratnoff OD. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 145:1310-2.
- Day A., Canada, F., Diaz J, Kroon, A., (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*. 468,166-170
- De Gaetano, G., De Curtis, A., di Castelnuovo, A., Donati, B., Iacoviello, L., Rotondo, S. (2002) Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann N Y Acad Sci*. 957: 174-188.
- Díaz Porras, H. V., Fuertes Ruitón, C., Whu Whu, D., Jurado Teixeira, B., Roque Alcarraz, M., Arroyo Acevedo, J. (2011). Efecto antiagregante plaquetario in vivo y fibrinolítico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(3), 225-234.
- Dreosti, I. E. (1996). Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutrition Reviews*, 54(11), S51.
- Edgington, T., Mackman, N., Brand, K., Ruf, W. (1991). The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thrombosis and haemostasis*, 66(1), 67-79.

Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., Araujo-Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud mental*, 35(5), 375-384. Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58225155004>. Fecha de consulta: 2 de junio de 2016

Ferreira, C., Sousa, D., DUSSE, L., Carvalho, D. (2010). O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revis. Bras. Hematol Hemoter*, 32(5), 416-421.

Franco, F. Fisiología da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina (Ribeirão Preto). 2001; 34(3/4):229-37.

García V, Crespo, M., Collado, S., Esteller A, Sánchez, S., Tuñón, J. (2007). Efecto antiinflamatorio de las flavonas quercetina y kaempferol en células del hígado de Chang implica la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible, ciclooxigenasa-2 y reactiva de proteína C y abajo-regulación de la vía de factor nuclear kappa B. *EUR J Pharmacol*; 557:221-229.

Gil, F., Milton, B., Trejos, J. (2009). Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de Brownea ariza Brenth. *Vitae*, 16(1), 93-101.

Gómez, R., Guerra, T., Dita, L., Fernández, J., Cabrera, M. (2011). Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *MediSur*, 9(2), 146-155.

Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygen and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*; 16, 845-50.

Handin RI, Lux SE, Stossel TP. Blood: principles and practice of hematology. 2a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.

Harborne J. Phytochemical Methods Second, Editon. Chapman and Hall, 1984; 55-60.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 13: 572–584.

Hellner W, Forkmann G: Biosynthesis. En: Harborne JB. Ed. The Flavonoids. Advances in Research since 1986. London. Chapman and Hall, 1993: 499–535.

Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. J Thromb Thrombolysis. 2003a; 16(1/2):17-20.

Hoffman M. A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Rev. 2003b; 17(Suppl 1):S1-5.

Hollman PC. H. (2004). Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Arch Physiol Biochem*; 42, 74-83.

Jedinák, A., Maliar, T., Grančai, D., Nagy, M. (2006). Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytotherapy Research*, 20(3), 214-217.

Kähkönen, M., Anu, I. (2001). Berry fenolics and their Antioxidant activity. J. Agric. Food Chem., 49, 4076 – 4082.

Khoo, T., Abas, F., Abdullah, O., Tohit, M., Hamid, M. (2014). Anticoagulant Activity of Polyphenolic-Polysaccharides Isolated from *Melastoma malabathricum* L. Hindawi Publishing Corporation.

Kim, H., Cho, M., Reddy, M., Kim Y., (2005) Efecto Kim Y: Abajo-regulación de quercetrina galato en la expresión factor nuclear kappaB dependiente inducible del óxido nítrico sintasa estimulada por el lipopolisacárido de macrófagos RAW 264.7. *BIOCHEM Pharmacol*, 69,1577-1583

Kwon, H., Murakami, A., Tanaka, T., (2005) Rutina dietética h Ohigashi, pero no la quercetina aglicona, mejora dextran sulfato sódico-inducido experimental colitis en ratones: atenuación de la expresión de genes proinflamatorios. *Biochem Pharmacol*, 69,395-406.

Laughton, J., Evans, J., Moroney, A., Houlst, R., Halliwell, B. (1990). Inhibition of mammalian 5 lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability, 42, 1673–1681.

Lee, W., Kim, J., Lee, J., Lee, Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wines. *J Agric Food Chem.*, 51, 7292-7295.

Leighton, F., Urquiaga, I. (2001). Polifenoles del vino y salud humana, antioxidantes y calidad de vida. Revista Antioxidantes y Calidad de Vida Online, Pontificia Universidad Católica de Chile. En: www.Antioxidantes.Com.Ar/Home2.htm.

Leifert, R., (2008). Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res*; 28: 729-737.

Link, P. (1959). The discovery of dicumarol and its sequels. *Circulation*; 19(1):97-107.

Liu, L., Ma, H., Yang, N., Tang, Y., Guo, J., Tao, W., Duan, J. (2010) A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: structure-activity relationships. *Thromb Res*.126 (5), 365-378.

Lock, O. Investigación Fitoquímica. Método en el Estudio de Productos Naturales. 2da. ed. Perú: Edit. Fondo UCP. 1994. 269-285.

Luis, A., Aller R. (2008) Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. *An Med Interna*, 25(3), 105-7.

Mabry, T., Markham, K., Thomas, M. The sistematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag New York-Heidilberg. Berlin. . 1970. 9-155.

Macfarlane, G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*, 202,498-9.

Maliar, T., Jedinák, A., Kadrabová, J., Šturdík, E. (2004). Structural aspects of flavonoids as trypsin inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 39(3), 241-248.

Malý, A., Tomasov, P., Hájek, P., Blasko, P., Hrachovinová, I., Salaj P., Veselka J. (2007).The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiol Res.*, 56(6) , 685-95.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.

Martínez-Flores, S., Gutiérrez, B., Sánchez, S., González, J., Tuñón, J. (2005). Quercetina evita la producción de óxido nítrico y factor nuclear kappa B activación en hepatocitos de rata interleukin-1 β -activado. *J Nutr.*, 135, 1359- 1365.

Martínez-Flores, S., Jiang, M., Shi, J., Tomás, A., Datta, N., Singanusong, R. (2004). Los flavonoides presentes en los alimentos y sus beneficios para la salud. *Planta de Alimentos Nutr. Humano*, 59,113-122.

Monroe, M., Hoffman, M. (2009).The coagulation cascade in cirrosis. *Clin Liver Dis.*; 13(1) ,1-9

Moreira, U., Fraga, C., Alonso, M., Collado, S., Zettelr, C., Marroni, N., González, J. (2004). La quercetina previene el estrés oxidativo y la activación de NF-kappaB en la mucosa gástrica de ratas con hipertensión portal. *Biochem Pharmacol*, 68, 1939-1946.

Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Eleuteri, A. M., Fioretti, E., Angeletti, M. (2006). Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. *Biochimie*, 88(9), 1297-1306.

Nápoles, D., Nápoles, D. (2012). Hemostasia normal y coagulación intravascular diseminada en obstetricia. *MEDISAN*, 16(3), 401-428. Recuperado en 06 de junio de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000300013&lng=es&tlng=es.

Németh, K., Plumb, W., Berrin, G., Juge, N. (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr.*, 42, 29-42.

Nijveldt, J., Van Nood, E., Van Hoorn, E., Boelens, G., Van Norren K, Van Leeuwen, A. (2001).Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.*, 74, 418- 425.

Ohtsuki, T., Himeji, M., Fukazawa, H., Tanaka, M., Yamamoto, H., & Mimura, A. (2009). High-yield production of scutellaria radix flavonoids (baicalein, baicalin and wogonin) by liquid-culture of *Scutellaria baicalensis* root-derived cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 2, 291-298.

Olvera V. "Efecto y mecanismo de acción del extracto acuoso de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Sobre la proliferación de células HeLa." Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Programa de Postgrado en Alimentos del Centro de la República. México, 2003.

Orallo, F., Alvarez, E., Camiña, M., Leiro, M., Gómez, E., Fernández, P. (2002). The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol*, 61, 294-302.

Pawlaczyk I, Lewik-Tsirigotis M, Capek P, Matulová M, Sasinková V, Dąbrowski P, Witkiewicz W, Gancarz R (2013). Effects of extraction condition on structural features and anticoagulant activity of *F. vesca* L. conjugates. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 741–750

Peres, W., Tuñón, M., Mato, S., Collado, P., González-Gallego J. (2000). Efectos hepatoprotectores del flavonoide quercetina en ratas con obstrucción biliar. *J Hepatol*, 33, 742-750.

Pérez G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 22(1).

Pérez-Gómez, F., Bover, R. (2007). La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Rev Esp. Cardiol.*, 60(12), 1217-9.

Pérez-Vizcaíno, F., Ibarra, M., Cogolludo, L., Duarte, J., Zaragoza- Arnáez, F., Moreno, L., López-López, G., Tamargo, J. (2002) Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.*, 302, 66-72.

Quintero-González, J. (2010). Cincuenta años de uso clínico de la warfarina. *Investigación Clínica*, 269-287.

Quiñones, M., Miguel, M., Alexandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables. *Nutr Hosp.*, 27(1), 76-89.

Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 507-526 2008. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101372/1/Los%20polifenoles.pdf>

Raza, John. (2005) Green tea polyphenol epigallocatechin-3- gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207, 212-220.

Riddel Jr JP, Aouizerat, B., Miaskowski, C., Lillicrap, D. (2007). Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 24(3), 123-31.

Robbins, R. (2003)"Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (10), 2866-2887.

Rojas R, Doroteo V , Díaz C , Vaisberg A , Neira M ,Terry C. Actividad antioxidante, anti-elastasa, anti-colagenasa, protectora contra rayos UV-B, promotora de síntesis de colágeno in vitro y estudios de seguridad y eficacia de extractos de Bixa orellana ("achiote") y Oenothera rosea ("chupasangre"). http://apqc.org.pe/boletines/ago-13/Trabajo_Colamiqc_2013.pdf

Ruitón, M., Alcarraz, M., Vidalón, M. (1998). Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* CC Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*, 1(2), 71-80.

Russo, R., Speranza, S. (2006) Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Rev Costarric Cardiol.*, 8(1) ,13-8.

Sánchez Gallego, J. I. Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. Tesis para Optar el Grado de Maestro. Universidad Salamanca. España. 2002

- Surh, Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 768-780.
- Tollefsen, D. (1995). Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thromb Haemost*; 74 (5), 1209-14.
- Torres, U., Palomo, G., Guzmán, J., Moore, C. Efecto antitrombótico, una característica poco conocida de las frutas y hortalizas. *Revista Chilena de Nutrición*. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=469351002>. Fecha de consulta: 18 de mayo de 2016.
- Valen, G., Sigurdardottir, O., Vaage, J. (1996). Systemic release of thrombomodulin, but not from the cardioplegic, reperfused heart during open heart surgery. *Thromb Res.*, 83(4) ,321-8.
- Villena, C. A., Arroyo, J. L. (2012). Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar Socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. *Ciencia e Investigación*, 15(1), 15-19.
- Vine, A. (2009). Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina*, 29(1), 1-7.
- Viskupicova, J., Danihelova, M., Viskupicova, M., Majekova, M., Liptaj, T., Sturdik, E. (2012) Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: a quantum-chemical QSAR analysis. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 27(6), 800-9.
- Wagner, H., Farkas, L.: Synthesis of flavonoids. En: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H. Eds. *The Flavonoids. Part I*. New York. Academic Press. 1975, 127–213.
- Yamada, K., Naemura, A., Sawashita, N., Noguchi, Y., Yamamoto, J. (2004). An onion variety has natural antithrombotic effect as assessed by thrombosis/thrombolysis models in rodents. *Thrombosis Research*, 114 (3), 213–220.
- Yamamoto, S., Yoshimoto, T., Furukawa, M., Horie, T., Watanabe-Kohno, S. (1984). Arachinodate S-lipoxygenase and its new inhibitors. *J Allergy Clin Immunol*, 74: 349–352.

Yang, K., Lamprecht S., Liu, Y., Shinozaki, H., Fan, K., Leung, D. (2000). Estudios de quimiopreención del flavonoides quercetina y rutina en colon normal y tratada azoxymethane-ratón. *Carcinogenesis*, 1, 1655-1660.

Yarlequé A. (1987). Enzima similar a la Trombina del veneno de la serpiente *Lachesis muta*: Aislamiento, caracterización bioquímica y acción biológica. Tesis doctoral de la UNMSM, Lima-Perú., 14-17.

Yarlequé, M., Bonilla, P., Rueda, L. (2002).Aislamiento de flavonoides de *Mutisia acuminata* “chinchilcoma” y su efecto sobre el plasma humano. Las Jornadas San Fernandinas .Anales de la Facultad de Medicina de la UNMSM.Lima Perú.

Yarlequé, M., Rueda, L., Yarlequé, L. (2007).Efecto anticoagulante in vitro del extracto acuoso de *Oenothera rosea* Aiton”chupasangre”. Las Jornadas San Fernandinas Anales de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Lima Perú.

Yarlequé, M., Ortiz, C., Morante, Y., Yarlequé, A. (2012). Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 78 (1).

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática. Ed rev atual. São Paulo: Atheneu; 2005: 1081.

XI. GLOSARIOS DE TÉRMINOS

Anticoagulante: sustancia que impide o retrasa la coagulación de la sangre, como la heparina o la warfarina.

Antitrombina III: glicoproteína compuesta por una sola cadena polipeptídica, que consta de 432 aminoácidos y un peso molecular de 58 KD. Se sintetiza en el hígado y es un potente inhibidor de la trombina y de otros factores de la coagulación de tipo serinoproteasas.

Citrato de sodio: sales quelantes de calcio, se utiliza como anticoagulante *in vitro*.

Compuestos Polifenólicos: Son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo

Cromatografía de capa fina: es un método cualitativo y cuantitativo que permite separar mezclas de sustancias, utilizando una fase móvil y una fase fija como la celulosa, requiere contar con un estándar de referencia para comparar su valor de factor de retardo (Rf) y el color de la mancha del estándar al ser revelada con agentes químicos.

Cumarina: Compuesto derivado de la 4-hidroxicumarina que tiene propiedades anticoagulantes y que se utilizan para prevenir trombosis y embolias. Los más conocidos son la Warfarina y acenocumarina.

Fenoles: Compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de uno o varios hidroxilos unidos a un anillo aromático.

Fibrina: proteína que se forma a partir del fibrinógeno por acción de la trombina, forma agregados con otras fibras de fibrina durante la coagulación de la sangre.

Fibrinógeno: proteína de 340 KDa precursora de la Fibrina.

Flavonoides: Son compuestos fenólicos, que se caracterizan por presentar dos anillos de fenilos unidos por uno de pirano y muchos hidroxilos.

Heparina: mucopolisacárido que impide la formación de trombina y el paso de protombina por trombina. La producen los leucocitos basófilos y los mastocitos.

Maceración: es el procedimiento para extraer los principios activos de la droga.

Principios Activos: son sustancias que poseen efecto terapéutico.

Trombina: enzima formada en el plasma durante el proceso de coagulación a partir de la protrombina, en presencia de calcio y tromboplastina.

XII. ANEXOS

ANEXO 1. Clasificación Taxonómica de *O. rosea* "chupasangre"



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 10-USM-2016

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas y flor) recibida de **Mirtha M. YARLEQUE CHOCAS**, alumna de la UNMSM de la Fac. de Ciencias Biológicas; ha sido estudiada y clasificada como: ***Oenothera rosea* Aiton** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: MYRTALES

FAMILIA: ONAGRACEAE

GENERO: *Oenothera*

ESPECIE: *Oenothera rosea* Aiton

Nombre vulgar: "chupasangre"
Determinado por Mag. María Isabel La Torre.

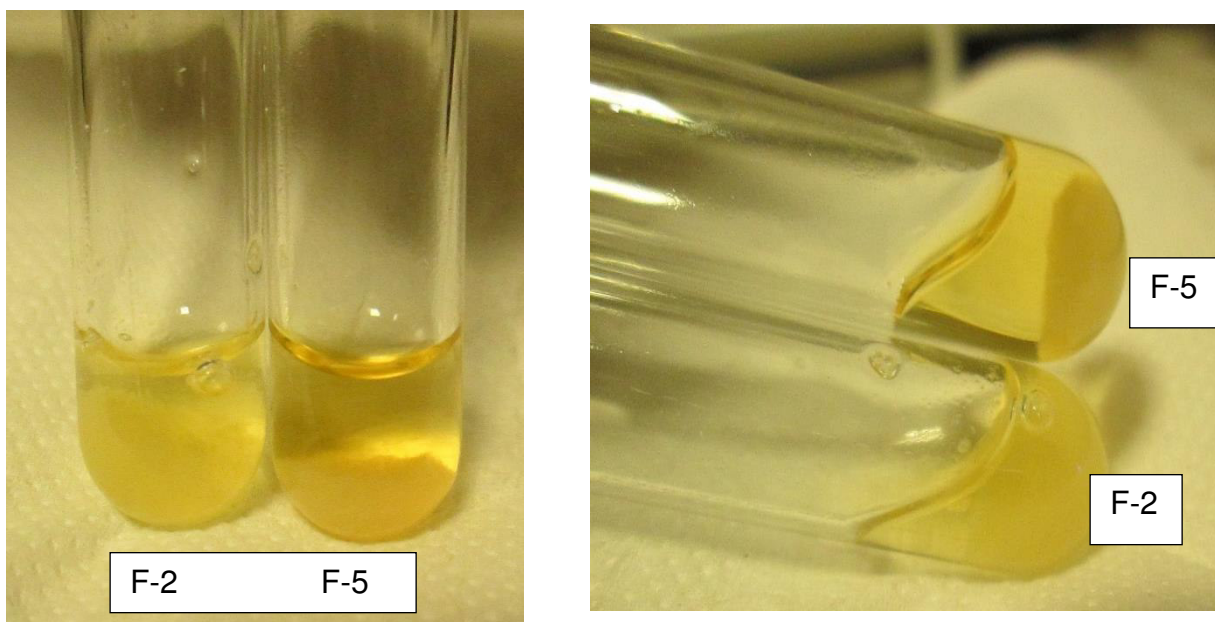
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.



Fecha, 29 de enero de 2016


Dra. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS

ANEXO 2.Efecto anticoagulante de la Fracción 2 y 5 sobre el plasma humano citratado.



F-2 y F-5 inhibieron la coagulación del plasma humano citratado por la Trombina y el veneno de serpiente *L.muta*.

ANEXO 3. Espectrofotómetro UV-Vis 190 a 700 nm



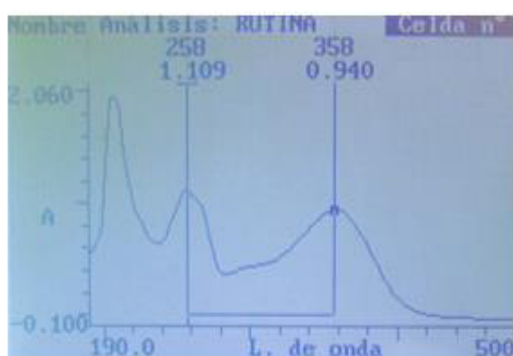
ANEXO 4: Factores que participan en la coagulación sanguínea

Factor	Sinónimo
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Factor histico ,factor tisular
Factor IV	Calcio
Factor V	Proacelerina, factor lábil
Factor VI	No asignado
Factor VII	Proconvertina, autoprotrombina I
Factor VIII	Factor antihemofílico A.Globulina antihemofílica
Factor IX	Factor Christmas ,factor antihemofílico B
Factor X	Factor Stuart-Power,trombocinasa,autoprotrombina III
Factor XI	Antecedente protromboplástico
Factor XII	Factor Hageman
Factor XIII	Factor estabilizante de la fibrina
Precalicroína	Factor Fletcher
Cininógeno de alto peso molecular	Factor De Fitzgerald-Williams-Flaujeauc

ANEXO 5.Evaluación de las fracciones Obtenidas de la CCF sobre celulosa de la fase acuosa de
O.rosea

Muestra	RF	Reacción con Cloruro Férrico	Reaccion de Shinoda
Extracto acuoso		Verde oscuro	Anaranjado
F-1	$1/18= 0.05$	Verde	Amarillo
F-2	$2/18= 0.11$	Verde	Rosado
F-3	$5/18= 0.27$	Verde oscuro	Rojo claro
F-4	$9/18= 0.5$	Azul oscuro	Rojo claro
F-5	$10.5/18= 0.58$	Azul oscuro	Rosado
F-6	$12/18= 0.66$	Verde	Rosado muy claro
F-7	$13.5/18= 0.75$	Verde	Incoloro
F-8	$15.5/18= 0.86$	Verde oscuro	Incoloro
F-9	$17/18= 0.94$	amarillo	Incoloro

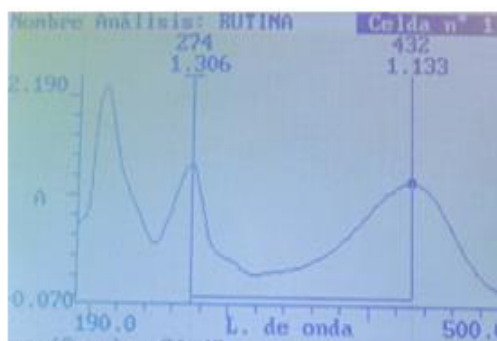
ANEXO 6: Espectros UV-Vis de la Rutina con reactivos de desplazamiento



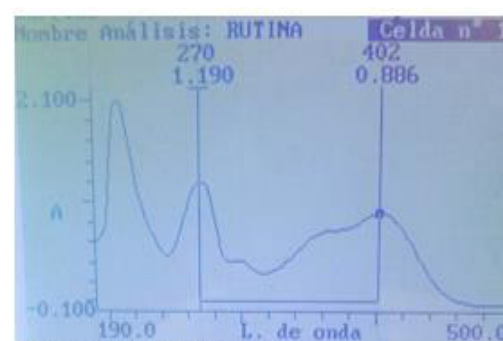
A: Rutina en metanol



B: En metanol+ metóxido de sodio



C: En metanol + AlCl_3



D: En metanol+ AlCl_3 + HCl

ANEXO 7: Estructura Química de Rutina obtenida por espectrofotometría UV-Vis

λ_{MeOH} 258,358 nm

Máx

$\lambda_{\text{Metox.Na}}$ 272,410 nm

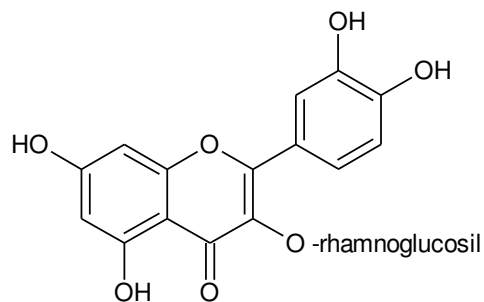
Máx

$\lambda_{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ 274,432 nm

Máx

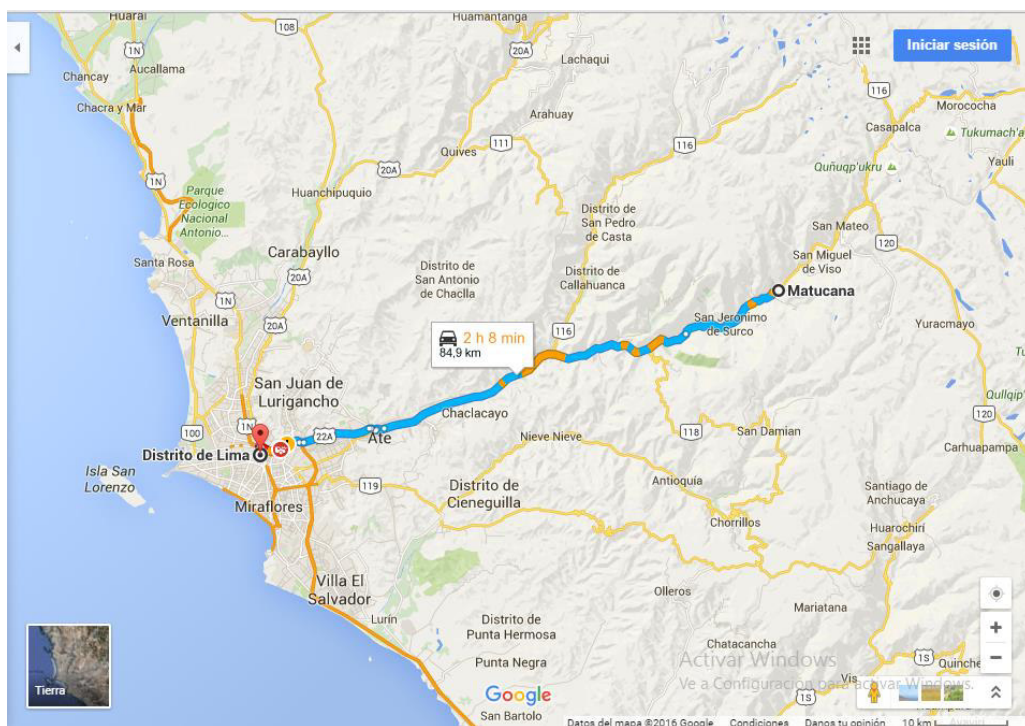
$\lambda_{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ 270,402 nm

Máx



3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-rhamnoglucosil
flavonol (RUTINA)

ANEXO 8: Ubicación geográfica de Matucana lugar de recolección de *Oenothera rosea*



Fuente: www.google.es/maps/dir/Matucana,+Perú/Distrito+de+Lima,+Perú